

THÈSES

pour le

DOCTORAT EN PHARMACIE (DIPLOME D'ÉTAT)

par

Françoise REGERAT

Pharmacien

Attaché de Recherches au C. N. R. S.

présentées et soutenues publiquement en Juin 1967

**Première thèse - ÉTUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DU
TRICHOLOME PRÉTENTIEUX ET DE QUELQUES AUTRES
TRICHOLOMES.**

**Deuxième thèse - SUBSTANCES ANTIBIOTIQUES RETIRÉES DES
VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS.**

Président : M. POURRAT, *Professeur*

Membres du Jury : MM. GOUTAREL, *Directeur de Recherches au C. N. R. S.
(Gif sur Yvette)*

TRONCHE, *Professeur*

M^{me} POURRAT, *Maître de Conférences Agrégé*

IMPRIMERIE REIX
54, boulevard Berthelot
CLERMONT-FERRAND

—
1967

UNIVERSITÉ DE CLERMONT-FERRAND
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1967

N°

THÈSES

pour le

DOCTORAT EN PHARMACIE (DIPLOME D'ÉTAT)

par

Françoise REGERAT

Pharmacien

Attaché de Recherches au C. N. R. S.

présentées et soutenues publiquement en Juin 1967

**Première thèse - ÉTUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DU
TRICHOLOME PRÉTENTIEUX ET DE QUELQUES AUTRES
TRICHOLOMES.**

**Deuxième thèse - SUBSTANCES ANTIBIOTIQUES RETIRÉES DES
VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS.**

Président : M POURRAT, *Professeur*

Membres du Jury : MM. GOUTAREL, *Directeur de Recherches au C. N. R. S.*
(Gif sur Yvette)

TRONCHE, *Professeur*

M^{me} POURRAT, *Maître de Conférences Agrégé*

IMPRIMERIE REIX

54, boulevard Berthelot
CLERMONT-FERRAND

—
1967

UNIVERSITÉ DE CLERMONT-FERRAND

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

DIRECTEUR HONORAIRE :

M. MERLE

DOYEN :

G. MEYNIEL

ASSESEUR :

M. COULET

PROFESSEURS HONORAIRES :

Mme BLANQUET

MM. BUREAU, FOURNIER,

GAUTHIER et POMMÉ

I. — PROFESSEURS TITULAIRES

MM. BARRIER	Clinique chirurgicale A
BASTIDE	Chimie biologique et Pharmacodynamie
BAUDON	Clinique obstétricale
BERGERON	Pathologie médicale
COULET	Botanique et Microbiologie
CUVELIER	Hydrologie et Climatologie
DASTUGUE	Biochimie médicale
DAUPHIN	Chimie pharmaceutique et Toxicologie
DELAGE	Anatomie pathologique
FEBVRE	Pharmacie galénique
GRAS	Thérapeutique
JACQUEMET	Technique chirurgicale
JALLUT	Séméiologie médicale
LATAIX	Pathologie chirurgicale
MEYNIEL	Biophysique médicale
MOLINA	Clinique pneumo-phtisiologique
PETIT	Médecine légale et Médecine sociale
POROT	Clinique neurologique et psychiatrique
POURRAT	Matière médicale
ROUHER	Clinique ophtalmologique
TERRASSE	Clinique médicale B
THIEBLOT	Physiologie
THOMAS	Clinique oto-rhino-laryngologique
TRONCHE	Pharmacie chimique
TURCHINI	Histologie et Embryologie
VAURS	Bactériologie et Hygiène
WILLEMIN-CLOG	Clinique médicale infantile

II. — PROFESSEUR TITULAIRE A TITRE PERSONNEL

M. VIALLET Electro-Radiologie

III. — PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. ALFIERI Biophysique médicale
BERGER Chimie analytique
CLUZEL Bactériologie
DUCHENE-MARULLAZ Physiologie
GERMAIN Clinique chirurgicale B

IV. — MAITRES DE CONFERENCES AGRÉGÉS

M. BOSSY Anatomie
Mlle CHATONIER Chimie minérale et Minéralogie
Mme GAILLARD Physique pharmaceutique
M. MENUT Pédiatrie et Puériculture
Mme MOINADE Médecine générale et thérapeutique
M. PIGNIDE Médecine générale
Mme POURRAT Botanique
M. VENRIES
DE LAGUILLAUMIE Anatomie pathologique

V. — AGRÉGÉS

MM. CHAMPEIX Médecine légale et Médecine du Travail
FOURRIER Orthopédie
HOUDARD Chirurgie générale
JANNY Neuro-chirurgie
MERCIER Chirurgie générale
Mlle RAMPON Médecine générale
MM. RENARD Pneumo-phthisiologie
TOURNILHAC Neurologie et Psychiatrie

Attaché Principal : M. BERTHON

Conservateur de la Bibliothèque : M. ARCHIMBAUD

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentés à l'occasion d'une soutenance de thèse de doctorat en médecine ou en pharmacie doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner, ni approbation, ni improbation. (Délibération en date du 6 juin 1956).

A LA MEMOIRE DE MES PARENTS

A MON MARI

A MA FAMILLE

En témoignage de profonde affection.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A NOTRE MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR POURRAT

Professeur de Matière Médicale

*Qui nous a inspiré le sujet de cette thèse
et a guidé sans cesse nos recherches avec
une éminente compétence et une grande
bienveillance.*

*Il nous a fait l'honneur de nous accueillir
dans son laboratoire, nous faisant profiter
de la richesse de son enseignement et de
sa grande expérience en Chimie Végétale.*

*En témoignage de respectueuse et pro-
fonde gratitude.*

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR POURRAT

Professeur de Matière Médicale

Chevalier de l'Ordre du Mérite

Chevalier des Palmes Académiques

A NOTRE JURY DE THESE

MONSIEUR LE DOCTEUR GOUTAREL

Directeur Scientifique au C.N.R.S.
Sous-Directeur de l'Institut de Chimie
des Substances Naturelles (Gif-sur-Yvette)
Commandeur des Palmes Académiques

*Qui a apporté à notre travail un intérêt
bienveillant et qui nous a accueillie dans
son laboratoire pour nous initier à l'étude
des structures.*

En témoignage de respectueuse gratitude.

MONSIEUR LE PROFESSEUR TRONCHE

Professeur de Pharmacie Chimique
Chevalier des Palmes Académiques

Qui a accepté de juger ce travail.

*En témoignage de très sincère reconnais-
sance.*

MADAME POURRAT

Maître de Conférences Agrégé

*Qui nous a toujours prodigué ses conseils
éclairés et nous a aidés avec une grande
amabilité.*

*En témoignage de reconnaissance et de
profonde gratitude.*

INTRODUCTION

Les recherches effectuées sur la composition chimique des Cryptogames sont considérablement moins importantes que celles effectuées sur les Phanérogames. Chez les champignons on a surtout étudié ceux qui possèdent une toxicité élevée, quelques comestibles classiques, les levures en raison de leur grande utilisation, et surtout les champignons producteurs d'antibiotiques.

Leur relative rareté, jointe à une très grande difficulté de culture, a constitué certainement la raison principale de ce nombre restreint de travaux. Mais les difficultés de séchage et leur teneur très élevée en eau qui obligeait à disposer de quantités importantes, ont certainement joué un rôle primordial dans cette relative désaffection des chercheurs pour ces végétaux.

La prodigieuse rapidité avec laquelle ils fructifient aurait cependant dû inciter à rechercher quels étaient les corps qu'ils élaboraient, car il était certain que leurs produits de métabolisme étaient nettement différents de ceux des végétaux supérieurs.

On trouve les champignons sous toutes les latitudes, certains poussent sous les tropiques, d'autres, tels que les Russules, arrivent à fructifier dans l'Antarctique pendant les deux mois où la terre n'est pas gelée. Mais on les rencontre surtout sous les climats tempérés et particulièrement en Europe. Certaines espèces ont une aire de distribution géographique assez délimitée et le Centre de la France est considéré comme une des régions du globe privilégiées, tant par le nombre d'espèces que l'on y rencontre que par la quantité.

Les Tricholomes se classent parmi les espèces les plus répandues dans notre région. Leur composition chimique n'ayant pratiquement fait l'objet d'aucuns travaux, il nous a paru intéressant d'entreprendre cette étude.

Le genre *Tricholoma* comprend un nombre important d'espèces, il ne pouvait être question de les étudier toutes, c'est pourquoi nous nous sommes limités principalement à deux espèces qui se rencontrent couramment dans le Massif Central : *Tricholoma portentosum* et *Tricholoma equestre*. Certains résultats que nous avons obtenus nous ont conduits à effectuer quelques recherches sur la composition chimique d'autres espèces.

Nous avons cru bon de situer le genre *Tricholoma* dans la classification des champignons et de rappeler brièvement les caractères morphologiques des carpophores du *Tricholome* prétentieux et du *Tricholome* équestre. Ces quelques notions botaniques sont suivies par un résumé sur la composition chimique des champignons supérieurs.

Après un bref rappel des principaux constituants des végétaux : eau, éléments minéraux, glucides, lipides et acides aminés, nous nous sommes volontairement limités aux familles chimiques dont nous avons trouvé des représentants chez les champignons qui font l'objet de notre travail. Ceci nous a conduit à une mise au point sur les stérols d'origine fongique et également à un rappel des triterpènes isolés des champignons en raison de la grande analogie de structure entre ces deux groupes de corps, particulièrement chez les *Cryptogames*.

La teneur très élevée en eau des champignons jointe à une grande richesse en enzymes rendait particulièrement délicat le séchage. Nous avons étudié plusieurs procédés de dessiccation. L'un d'entre eux combine la stabilisation et la dessiccation partielle, c'est le chauffage hyperfréquentiel.

En raison de la faible teneur en corps originaux le problème de l'extraction était particulièrement important. Nous avons établi les conditions assez strictes dans lesquelles elles doivent être effectuées pour permettre l'isolement de produits définis.

La composition chimique du *Tricholome* prétentieux s'est révélée particulièrement intéressante. Nous l'exposons dans les quatrième, cinquième et sixième chapitres.

Nous nous sommes surtout attachés à l'étude des stérols. L'identification de l'Ergostérol est exposée dans le chapitre quatrième.

L'ergostérol, avec le cérevistérol, étaient les deux seuls stérols isolés jusqu'alors des *Basidiomycètes*. Nous avons retiré de ce champignon un nouveau stérol, le Portenstérol. Ce stérol n'avait non seulement jamais été isolé à l'état naturel, mais il n'avait pas été synthétisé. Ses propriétés et l'étude de sa structure font l'objet du cinquième chapitre.

Le dernier chapitre consacré à l'étude du *Tricholome* prétentieux traite des autres constituants. A côté des acides aminés, des sucres fermentescibles et du mannitol qui se rencontrent chez tous

les champignons, nous avons pu montrer la présence de savons acides et de soufre à l'état libre.

L'isolement de soufre libre mérite d'être souligné, car c'est la première fois qu'on le signale dans le règne végétal, autant chez les Cryptogames que chez les Phanérogames. Nous l'avons constamment retrouvé, ce qui rend indiscutable sa présence.

Le *Tricholome équestre* ne renferme pas de portenstérol, mais seulement de l'ergostérol. Ses autres constituants sont identiques à ceux du *Tricholome prétentieux*.

Un dernier chapitre est consacré à la recherche de l'ergostérol chez divers *Tricholomes* et chez quelques autres champignons.

En effet, comme nous avons trouvé l'ergostérol chez tous les *Tricholomes* où nous l'avons recherché, nous avons pensé qu'il pouvait être un constituant courant des *Basidiomycètes*. Cela semble être le cas mais devra être confirmé sur de nombreux exemples.

Cette recherche nous a conduits à mettre en évidence la présence, chez plusieurs champignons, de stérols, leur isolement et leur étude constituent une perspective importante de travail.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Matière Médicale de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Clermont-Ferrand. Nous tenons à exprimer ici notre profonde reconnaissance et notre respectueuse gratitude à notre Maître, Monsieur le Professeur POURRAT, dont les précieuses directives ont guidé nos recherches et qui nous a fait profiter journallement de ses profondes connaissances scientifiques.

Nous tenons à assurer Monsieur le Professeur JANOT de notre très respectueuse gratitude et à le remercier de nous avoir permis de faire un stage dans son laboratoire de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette.

Nous remercions le Centre National de la Recherche Scientifique pour l'aide matérielle qui nous a permis de réaliser ce travail.

Nous remercions Messieurs JARREAU, PARELLO et LONGEVIALLE qui, à des titres divers, nous ont aidés dans la réalisation de ce travail.

Nous remercions également Monsieur le Professeur GUY, Professeur de Physique à la Faculté de Pharmacie de Paris, qui a fait effectuer les spectres I.R. dans son laboratoire.

Nous exprimons également nos remerciements à Monsieur ARCHIMBAUD, Bibliothécaire universitaire.

Nous exprimons notre sympathie à tout le personnel du Laboratoire de Matière Médicale.

Nous assurons de notre profonde reconnaissance tous nos Professeurs de la Faculté mixte de Médecine et Pharmacie et de la Faculté des Sciences de Clermont-Ferrand.

Les points de fusion ont été déterminés soit au microscope Reichert à platine chauffante type RCH, soit en tube capillaire ouvert.

Les pouvoirs rotatoires ont été effectués à l'aide d'un polarimètre électronique Roussel Jouan et à l'aide d'un polarimètre « Bourgogne », avec monochromateur Bruhat, désignation « Savoie », de Jobin et Yvon.

Les spectres U.V. ont été mesurés avec un spectrophotomètre Jobin et Yvon, type Maroc.

Les spectres I.R. ont été effectués dans le Nujol, avec le spectrographe à double faisceau de Baird et avec un spectrophotomètre Perkin Elmer.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été réalisés sur un spectromètre Varian A 60 en utilisant comme solvant le deutérochloroforme parfois additionné de méthanol, suivant la solubilité du produit étudié. Les déplacements chimiques, exprimés en ppm, sont comptés à partir de la raie du tétraméthylsilane prise comme zéro de référence.

Les spectres de masse ont été enregistrés sur un appareil Atlas CH4 et sur un appareil MS 9.

Les chromatographies sur colonne ont été réalisées, sauf indication contraire, sur « Oxyde d'aluminium standardisé pour l'analyse d'absorption chromatographique d'après Brockmann », préparé par Woelm. On a utilisé de l'oxyde d'aluminium neutre d'activité 1.

Les chromatographies sur plaques ont été réalisées avec du Kieselgel G de marque Merck, selon la méthode de Stahl (80).

Les levures utilisées pour la fermentation des sucres sont des levures lyophilisées pour la vinification, *Saccharomyces oviformis*, fournies par l'Institut Pasteur.

L'ergostérol de référence est de l'« Ergosterine purum » fourni par les Etablissements Fluka. Nous l'avons cristallisé dans les mêmes conditions que le stérol que nous avons obtenu.

DESCRIPTION
DU
TRICHOLOME PRÉTENTIEUX
ET DU
TRICHOLOME ÉQUESTRE



TRICHOLOME PRÉTENTIEUX - *TRICHOLOMA PORTENTOSUM*

Ces clichés nous ont été aimablement
et sont extraits de l'ouvrage de A. M.



TRICHOLOME ÉQUESTRE - *TRICHOLOMA EQUESTRE*

Nous avons étudié au cours de ce travail deux champignons du genre *Tricholome* : le *Tricholome* prétentieux (*Tricholoma portentosum*) et le *Tricholome* équestre (*Tricholoma equestre*). Ces champignons appartiennent à la famille des Agaricacées, ce sont des comestibles très estimés.

Après avoir situé ces champignons dans la classification systématique nous donnerons une brève description de ces espèces en insistant sur les caractères qui permettent de les distinguer des espèces voisines. En effet, le genre *Tricholome* ne groupe pas seulement des espèces comestibles, mais aussi une espèce toxique et des comestibles très médiocres.

Parmi les nombreuses descriptions qui ont été faites de ces champignons dans les différents ouvrages que nous avons consultés, nous avons dégagé les critères qui nous ont semblé les plus caractéristiques. (21), (44), (51), (52), (61), (62), (76).

Pour la classification, nous avons retenu celle donnée par MAUBLANC (59) : le genre *Tricholoma* fait partie de la tribu des Tricholomées, famille des Agaricacées, ordre des Agaricales, Autobasidiomycètes.

Famille des Agaricacées.

La famille des Agaricacées, qui est une des plus importantes en cryptogamie, est une famille très hétérogène. Elle renferme, en effet, avec la grande majorité des espèces comestibles, de nombreux champignons dangereux.

Cette famille est divisée en plusieurs séries d'après la couleur des spores.

Cependant, il n'existe pas de classification définitive, la limite entre certains genres est parfois incertaine et des champignons différents peuvent être reliés entre eux par toute une gamme de types intermédiaires.

Parmi les Agaricacées les moins élevés en organisation se trouve la tribu des Tricholomées. Chez les Tricholomées, en effet, on n'observe pas de différence de structure entre le chapeau et le pied, et ceux-ci ne sont pas séparables l'un de l'autre.

Genre Tricholoma.

Les Tricholomes sont des champignons généralement robustes et trapus. Le pied et le chapeau sont charnus, à chair ferme. Le voile général est nul ou fibrilleux, les lamelles sinuées, émarginées, les spores lisses, blanches, non amyloïdes.

Ce sont essentiellement des espèces sylvoles répandues dans les régions tempérées froides et subtropicales. Il a été décrit une soixantaine d'espèces de Tricholomes.

Tricholoma portentosum. (Fries. Quélet).

Le Tricholome prétentieux est un champignon que l'on trouve en automne dans les forêts de conifères.

Le chapeau a 4 à 10 cm de diamètre, il est charnu, convexe ou conique puis étalé et mamelonné, à marge ondulée, parfois lobée chez les champignons plus mûrs. Il est glabre, lisse, visqueux, de couleur gris noirâtre à reflets ardoisés ou violets, parfois teinté de jaune et rayé de fibres radiales ou de fibrilles enchevêtrées d'un noir violacé.

Le pied est cylindrique, de 6 à 10 sur 1 à 2,5 cm, fibreux, rigide, blanc, un peu lavé parfois de jaune pale ou de gris avec quelques flocons noirâtres à sa partie supérieure.

La chair est épaisse au centre, amincie vers les bords, teintée sous la cuticule de jaune ou parfois de violacé selon ROMAGNESI. Elle présente une odeur et une saveur de farine.

Les lamelles sont larges, espacées, sinuées, assez épaisses, blanches parfois lavées de jaune, de grisâtre ou de verdâtre.

Les spores sont blanches, en masses, lisses, ovoïdes et non amyloïdes, de 5 à 7 sur 4 à 5 μ .

Il faut noter que le chapeau de ce champignon, avec ses fibrilles brunes ou noires, peut présenter une certaine analogie avec celui de l'Amanite phalloïde. Il est indispensable d'observer le pied qui, dans le cas du Tricholome prétentieux, ne possède jamais ni anneau ni volve.

Le Tricholome prétentieux peut être confondu avec *Tricholoma sejunctum* (Sow, ex Fr.), comestible médiocre à chair amère, dont le chapeau jaune est couvert de fibrilles brunes.

Le Tricholome tigré (*Tricholoma pardinum* Qu. ou *tigrinum*), autre espèce voisine toxique, se différencie du Tricholome prétentieux par ses lamelles jaunes, épaisses et serrées et les squames bistrées qui recouvrent son chapeau.

Tricholoma equestre. (Fries. Quélet).

Ce champignon a été autrefois confondu avec *Tricholoma flavovirens* (LUNDELL) qui désignait une espèce à chapeau sec.

Le *Tricholome équestre* se rencontre, comme le *Tricholome prétentieux*, en automne dans les bois de pins, surtout en terrain siliceux.

Le chapeau, de 4 à 10 cm de diamètre, est d'abord arrondi puis convexe ou étalé, parfois irrégulier. La surface en est lisse et visqueuse, de couleur jaune vif, plus foncée, roussâtre ou olivacée au centre, elle est généralement assombrie de mouchetures brunâtres ou grises, avec parfois de petites squamules.

Le pied est cylindrique, épais, ferme, fibrilleux, de couleur jaune soufre.

La chair, épaisse et blanche, est teintée de jaune sous la cuticule, de saveur douce, son odeur est nulle ou très fugitivement farineuse, suivant les auteurs.

Les lamelles sont larges, serrées, émarginées jaune vif.

La sporée est blanche, en masses. Les spores ellipsoïdales, de 6-7 sur 4-5 μ , sont lisses et non amyloïdes.

Le seul champignon qui pourrait être confondu avec le *Tricholome équestre* est le *Tricholome soufré* (*Tricholoma sulfureum* Bul ex Fr. Qu.). Celui-ci cependant a un chapeau lisse et sec, des lamelles espacées et une odeur très désagréable.

Le *Tricholome prétentieux* et le *Tricholome équestre* présentent certaines variétés physiologiques légèrement différentes. C'est ainsi que nous avons étudié des lots de champignons dont le pied était long et grêle, contrairement au pied trapu et épais des *Tricholomes* typiques.

Ces champignons avaient poussé dans un sous-bois dont le sol était recouvert de bruyères et d'*Ericacées*. Ils avaient dû traverser celles-ci pour trouver de meilleures conditions de développement et, de ce fait, le pied était beaucoup plus long.

Nous avons constaté que la composition chimique de ces échantillons était exactement la même que celle des variétés classiques. Il s'agissait donc uniquement d'une adaptation de la structure externe du champignon au milieu ambiant.

Précisons que nos recherches ont été effectuées à partir des carpophores à l'exclusion du mycelium qui ne pouvait évidemment pas être récolté. Adoptant le terme vulgaire de champignon, nous désignons ainsi le carpophore.

RECHERCHES
BIBLIOGRAPHIQUES

COMPOSITION CHIMIQUE

DES CHAMPIGNONS SUPÉRIEURS

De nombreux corps ont été isolés des champignons supérieurs, mais nous nous limiterons, dans notre bibliographie, aux familles chimiques auxquelles appartiennent les composés que nous avons mis en évidence dans les champignons étudiés.

En raison des difficultés de récolte des champignons et de leur forte teneur en eau, un nombre relativement restreint de corps en ont été extraits et parfaitement identifiés. Il s'agit surtout d'éléments minéraux, de constituants glucidiques, d'acides gras, d'acides aminés et de vitamines. Ces recherches ont eu surtout pour but de déterminer la valeur alimentaire des champignons comestibles. D'autres recherches ont été effectuées sur les triterpènes et les stérols, en particulier sur l'ergostérol et ses isomères, en raison de leur importance pharmaceutique.

TENEUR EN EAU

La teneur en eau est assez variable et dépend du moment de la récolte. Elle est toujours extrêmement importante, et, selon la consistance des échantillons, elle représente dans les espèces les plus répandues 80 à 90 % du poids du champignon frais. Elle est un peu inférieure pour les champignons appartenant à la famille des Polyporacées.

SZYMCZAK, en particulier, a signalé un pourcentage d'eau de 91,1 dans le *Tricholome prétentieux*, et de 90,9 dans le *Tricholome équestre*, alors que le *Bolet Bai* (*Boletus badius* Fr.) et le *Bolet jaune* (*Boletus luteus* Qu.) contiennent respectivement 89,5 et 90,5 % d'eau (82).

En raison de la texture des tissus constituant le carpophore et le pied, une partie plus ou moins importante d'eau peut être adsorbée en surface et rend difficile la détermination exacte de la teneur en eau incluse dans les tissus.

CONSTITUANTS MINÉRAUX

Parmi les constituants minéraux les métaux alcalins sont les plus fréquents. On a signalé en particulier le rubidium dont la présence semble générale chez les Cryptogames. La teneur en rubidium est particulièrement élevée dans les champignons du genre *Tricholoma* (8). *Tricholoma album* en contient par exemple 2.800 mg par kilo de champignons secs et *Tricholoma portentosum* 834 mg (14).

Le lithium et le potassium sont aussi très répandus. Le potassium se trouve soit sous forme de sels minéraux, à l'état de chlorure ou de phosphate, soit sous forme de sels organiques tels que le formiate, l'acétate, le citrate ou l'oxalate. On trouve également souvent des sels de césium (9). Par contre, l'ammonium et le sodium sont relativement rares.

Certains métaux paraissent spécifiques d'une espèce. Les champignons du genre *Amanita*, par exemple, contiennent des teneurs élevées en vanadium, de 150 à 180 mg par kilo de champignons secs.

Le zinc a aussi pu être caractérisé et dosé, sa teneur semble être caractéristique pour une espèce donnée (65). Le cuivre, le fer, le manganèse et le chrome ont aussi été mentionnés.

Il est intéressant de remarquer que, jusqu'à présent, on n'avait pas signalé la présence de métalloïdes dans les champignons.

CONSTITUANTS GLUCIDIQUES

Les champignons contiennent à la fois des oses et des polyols. Parmi les monoses on trouve surtout le d mannose provenant d'une transformation du mannitol et le d fructose. Le d glucose, moins fréquent, a été mis en évidence par les travaux de ZELLNER (90), puis ceux de chercheurs japonais (47). Il existe dans 30 % environ des espèces qui ont été étudiées, tels les genres *Amanita*, *Russula*, *Boletus* et *Psalliota*.

Le tréhalose, qui est un biose, peut être considéré comme le sucre typique des Basidiomycètes et sa présence est générale chez les champignons. (16), (17).

Il semble aussi que la présence du mannitol soit constante. Il a été mis en évidence dans la presque totalité des espèces étudiées par

les différents auteurs, en particulier BOURQUELOT (15) et FRERE-JACQUE (32). Sa teneur a même été déterminée dans les différentes parties de certains champignons : la Chanterelle (*Cantharellus cibarius* Fr.), l'Hydne sinué (*Hydnum repandum* Lin ex Fr.), le Bolet comestible (*Boletus edulis* Bul ex Fr.), le Lactaire délicieux (*Lactarius deliciosus* Fr.). Elle est pratiquement identique dans le pied et le chapeau, 3 à 4 %, l'hymenium en renfermant seulement 1 % (71).

Certains itols paraissent plus spécifiques, comme l'inositol dans le Lactaire poivré (*Lactarius piperatus* Sc. Fr.), le d arabitol dans la Langue de bœuf (*Fistulina hepatica* Sch. Fr.) (34). On a même trouvé des itols très peu répandus dans la nature comme le volémitol, heptol extrait du Lactaire à lait abondant (*Lactarius volemus* F.). L'erythrol et le sorbitol ont aussi été signalés (63).

Parmi les polyholosides de réserve à grosses molécules, le principal est le glycogène, particulièrement abondant chez les sujets jeunes (22), (87). Ceci distingue les champignons des plantes supérieures dans lesquelles les substances glucidiques de réserve se trouvent généralement sous forme d'amidon.

ACIDES GRAS

Les champignons contiennent en général de fortes proportions d'acides gras libres qui accompagnent les glycérides, et ces quantités pourraient, selon ZELLNER, augmenter par action de la lipase au cours du séchage des champignons.

Les acides gras les plus fréquemment rencontrés sont les acides oléique, palmitique, l'acide stéarique et ses dérivés. On trouve donc, chez les champignons, les acides gras les plus répandus chez les Phanérogames. Leur présence est constante, en particulier celle de l'acide stéarique chez les Lactaires (28). On trouve également parfois des acides gras fortement insaturés, dans *Clitocybe illudens* et *Colvatia gigantea* on a mis en évidence la présence d'acide linoléique à côté des acides oléique et palmitique (7).

Certains champignons renferment un grand nombre d'acides gras. C'est le cas du champignon de couche (*Agaricus campester*) chez lequel on a identifié les acides caprique, laurique, myristique, palmitique, margarique, stéarique, linoléique, linolénique et arachidique (26).

ACIDES AMINÉS

Les acides aminés d'un certain nombre d'espèces ont été identifiés récemment grâce à la chromatographie sur papier, par DURAND et BONNET (27), (13), puis SZYMCZAK (82).

L'étude d'extraits alcooliques de champignons stabilisés a permis de mettre en évidence pour chacun dix à vingt acides aminés libres dont certains se retrouvent de façon constante dans un genre déterminé. On a tendance actuellement à les considérer comme un critère chimiotaxinomique de classification des espèces (5), (59).

Les proportions respectives des différents acides aminés varient dans le champignon suivant les régions considérées (53). Dans le champignon de couche (*Agaricus campester* var. *hortensis*) par exemple, c'est le chapeau qui contient la plus grande concentration totale en amino acides, en particulier en acide glutamique, alanine, glycine, glutamine et asparagine. Le pied est riche en arginine et ornithine, alors que l'hyménium contient la plus forte concentration de thréonine.

La composition complète en aminoacides de certains champignons a pu être établie (24), (55), (89).

Ces études ont permis de mettre en évidence la fréquence de l'acide glutamique, l'alanine, l'acide aspartique, la valine et la leucine alors que la méthionine et le tryptophane sont rarement caractérisés.

Cette très faible teneur en deux acides aminés essentiels a modifié le jugement que l'on portait précédemment sur la valeur alimentaire des champignons.

SZYMCZAK, qui a étudié le *Tricholome* prétentieux et le *Tricholome* équestre, a obtenu les résultats suivants, en particulier pour le *Tricholome* prétentieux : la substance sèche renferme 15,19 % d'acides aminés totaux dont l'azote représente 47,31 % de l'azote total. Les acides aminés les plus importants sont l'isoleucine 1,73 %, l'acide glutamique 1,56 % et la leucine 1,53 %. Il faut noter la très faible teneur en acides aminés soufrés : cystéine 0,07 % et méthionine 0,23 %.

Les champignons ne renferment donc pas des quantités importantes d'acides aminés (39).

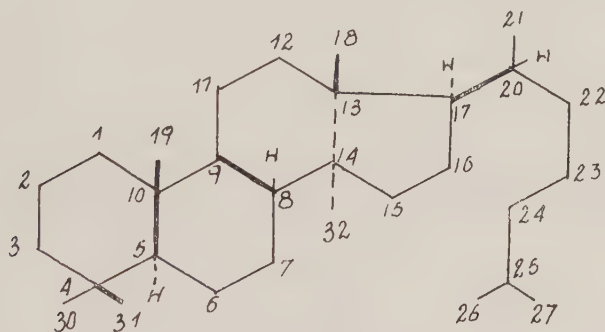
TRITERPENES ET STEROLS

Un certain nombre de triterpènes ont été isolés de champignons inférieurs, d'Ascomycètes et de quelques Basidiomycètes. Toutes ces recherches montrent que les champignons paraissent incapables de synthétiser les triterpènes pentacycliques. En effet, tous les triterpènes qui ont été extraits des champignons dérivent du squelette Lanostane et font donc partie des triterpènes tétracycliques.

Il est intéressant de noter que l'on a pu isoler dans une algue verte, à côté de stérols connus, un triterpène pentacyclique : la friédeline (85). Certains auteurs pensent que la synthèse des triterpènes pentacycliques serait liée à la présence de la chlorophylle et le fait

que l'absence de chlorophylle soit un critère caractéristique des champignons est en faveur de cette hypothèse.

Il existe une très grande analogie de structure entre les triterpènes tétracycliques et les stéroïdes. Ces deux groupes de composés comprennent en effet un squelette cyclopentanoperhydrophénanthrénique diversement substitué. Tous les triterpènes tétracycliques des champignons ayant comme squelette de base le lanostane, nous ne mentionnerons donc pas les dérivés à squelette euphane, dammarane et onocerane ; ceux-ci n'ont été isolés, à notre connaissance, que des plantes supérieures.



Lanostane

Les numéros 28 et 29 sont réservés pour les atomes de carbone surnuméraires de la chaîne.

Nous rappelons que pour les triterpènes tétracycliques et les stéroïdes on distingue les dérivés β et les dérivés α . Les substituants situés du même côté du squelette polycyclique que le groupement méthyl C19 (en C10) sont dits β , les autres α . Sur la formule nous avons représenté les liaisons β en traits pleins et les liaisons α en pointillés.

Triterpènes isolés des champignons.

Chez les Myxomycètes on a signalé l'existence de résines triterpéniques qui n'ont pas été identifiées. Des champignons imparfaits (fungi imperfecti) on a isolé l'acide éburicoïque, ce qui les rapproche des Basidiomycètes, et des triterpénoïdes doués de propriétés antibiotiques : les cephalosporines de *Cephalosporium* et l'acide fusidique de *Fusidium coccineum* (12).

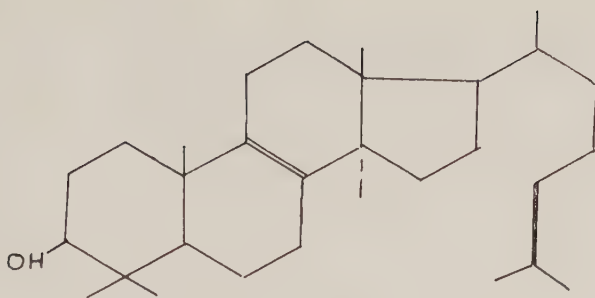
Deux triterpènes ont été extraits des Ascomycètes et identifiés, ce sont l'acide helvolique d'*Aspergillus fumigatus* et, à partir des Saccharomycètes, le cryptostérol qui a été identifié au lanostérol.

Chez les Basidiomycètes seuls les triterpènes extraits des champignons de la famille des Polyporacées ont été identifiés jusqu'à maintenant. Nous les avons groupés dans le tableau suivant :

Triterpènes	Formule	F	$[\alpha]_D$	Origine
<i>Acides :</i>				
Ac. éburicoïque	$C_{31} H_{50} O_3$	293°	+ 39° Py	Polyporus off., eucalyptorum, anthracophilus, sulfureus, hispidus, Poria cocos, Lentinus dactyloides.
déhydroéburicoïque	$C_{31} H_{48} O_3$	286-288°	+ 40°	
Ac. traméténolique B	$C_{30} H_{48} O_3$	253-258°	+ 43° Py	Trametes odorata.
ester méthylique	$C_{31} H_{50} O_3$	132-135°	+ 52°	Trametes odorata.
ester diméthylique	$C_{33} H_{52} O_4$	135-137°	+ 7°	Polyporus pinicola.
Ac. traméténolique A	$C_{30} H_{48} O_3$	259-261°	+ 47° MeOH	Trametes odorata, Polyporus pinicola.
Ac. polyporénique A = unguinique	$C_{31} H_{50} O_4$	199-200°	+ 64° Py	Polyporus betulinus.
Ac. polyporénique C	$C_{31} H_{46} O_4$	273-276°	+ 6° Py	Polyporus betulinus, benzoïnus, pinicola.
Ac. tumulosique et dihydrotumulosique	$C_{31} H_{50} O_4$	306°	+ 8° Py	Polyporus tumulosus, australiensis, betulinus, Poria cocos.
Ac. pinicolique	$C_{20} H_{46} O_3$	197-202°	+ 68°	Polyporus pinicola.
<i>Alcools :</i>				
21 hydroxy-3-cetolanosta-8-24-diène	$C_{30} H_{48} O_2$	114-117°	+ 68°	Polyporus pinicola.
3-21-dihydroxylanosta-7-9(11)-24-triène	$C_{30} H_{48} O_2$	194-197°	+ 72°	Polyporus pinicola.
et 3-ceto-21-hydroxylanosta-7-9(11)-24-triène		119-121°	+ 56°	Polyporus pinicola.

Ces triterpènes, de formule très voisine, semblent être caractéristiques de la famille des Polyporacées.

Le Lanostérol lui-même a été isolé d'*Inonotus obliquus* (Pers.) Polyporacées (56).



Lanostérol

Passage des triterpènes aux stérols.

La limite n'est pas toujours nette entre le domaine des triterpènes tétracycliques et celui des stéroïdes. Lorsqu'un nouveau composé est isolé on rencontre parfois certaines difficultés pour le classer soit parmi les triterpènes, soit parmi les stérols.

L'acide éburicoïque, par exemple, a été extrait de nombreux Polypores, en particulier de l'« agaric officinal » utilisé en médecine populaire. Il avait été considéré par les premiers chercheurs comme un stérol et nommé agaricol. Les nombreux travaux qui suivirent montrèrent que l'agaricol était en réalité un mélange d'acides triterpéniques à partir duquel on a isolé l'acide éburicoïque (12).

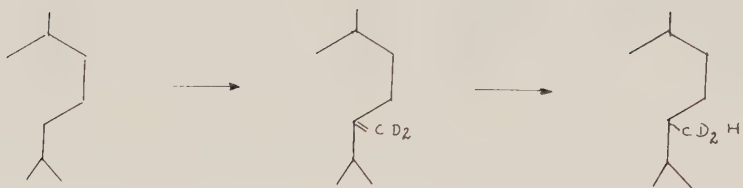
Le cryptostérol isolé des levures a été aussi considéré comme un stérol avant d'être identifié au lanostérol.

La synthèse totale de ces triterpènes tétracycliques du groupe du lanostérol a montré qu'ils étaient des stéroïdes avec trois groupements méthyles supplémentaires. C'est pour cette raison qu'on les appelle parfois des triméthylstéroïdes.

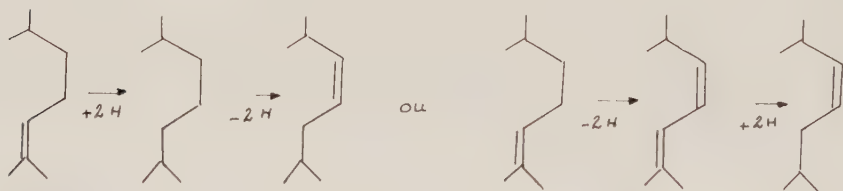
Les champignons peuvent convertir le lanostérol en stéroïdes par une série d'oxydations et de décarboxylations enzymatiques qui éliminent les méthyles en position 30, 31 et 32.

La fixation du méthyle supplémentaire en C24 dans la chaîne latérale de l'ergostérol se fait, à partir du lanostérol, par l'intermédiaire de la méthionine (1).

Il a été prouvé, en utilisant des éléments marqués, qu'il n'y a que deux hydrogènes du groupe méthyle en C24 qui proviennent de la méthionine. Il y a donc formation d'un composé intermédiaire à groupement méthylène qui est ensuite réduit.



Il reste à résoudre le problème du mécanisme de réduction. L'oxydation qui crée la double liaison en C22-C23 précède-t-elle ou non la réduction de la double liaison C24-C25 ? L'état actuel des recherches ne permet pas de conclure.



Stérols isolés des champignons.

L'existence des stérols a été mentionnée depuis longtemps. Dès les premiers travaux sur les champignons, GERARD, en 1894 (40), avait signalé dans les extraits étherés ou éthéro-alcooliques la présence de « cholestérines végétales ». En même temps, TANRET découvrait dans l'ergot de seigle l'ergostérol, $C_{28}H_{44}O$, qui a été retrouvé depuis dans plusieurs champignons, comme nous le verrons ultérieurement. Il avait isolé également le fungistérol qui, après avoir été considéré comme un mélange de stérols, a été identifié au γ ergostérol (88).

L'ergot de seigle (*Claviceps purpurea*) contient également du stigmastérol, $C_{29}H_{48}O$, et du campestérol, $C_{28}H_{48}O$.

De l'Amanite phalloïde (*Amanita phalloïdes*) on a isolé le cérévistérol, $C_{28}H_{46}O_3$, seul de ces stérols à posséder trois fonctions hydroxyles.

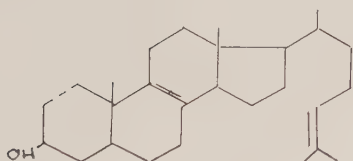
Nous noterons aussi la présence de spinastérol, $C_{29}H_{48}O$, chez *Boletus edulis*, de 5-6 dihydroergostérol chez *Polyporus betulinus* (50), et de Brassicastérol à l'état de traces chez *Trichophyton schoenlimi* (3).

Les Ascomycètes contiennent, à côté de l'ergostérol et du cérévistérol, certains stérols spécifiques : le zymostérol $C_{27}H_{44}O$, l'ascostérol $C_{28}H_{46}O$, l'épistérol $C_{28}H_{46}O$ et le fecostérol $C_{28}H_{46}O$ (36).

Tous les stérols isolés des champignons sont caractérisés par la présence d'une fonction alcoolique en position 3, d'une ou deux doubles liaisons et, portée par le carbone 17, d'une chaîne carbonée aliphatique plus ou moins ramifiée et insaturée.

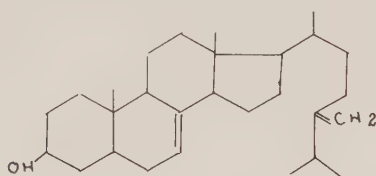
Les recherches bibliographiques nous montrent le faible nombre de stérols isolés des champignons : quatre sont spécifiques des Ascomycètes, six se trouvent chez les Basidiomycètes mais ils n'en sont pas spécifiques. Le nouveau stérol que nous avons isolé paraît être, avec le cérévistérol, les seuls stérols typiques des champignons.

STEROLS SPECIFIQUES DES ASCOMYCETES



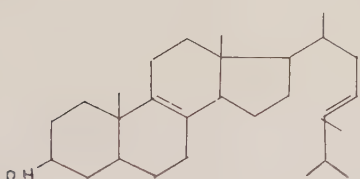
Zymostérol

F : 110° [α] D : + 49°



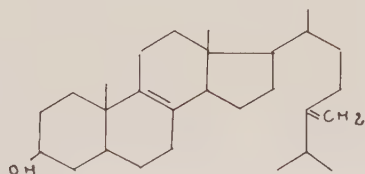
Epistérol

F : 151° [α] D : — 5°



Ascostérol

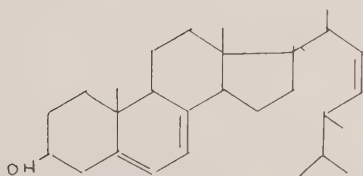
F : 142° [α] D : + 45°



Fécostérol

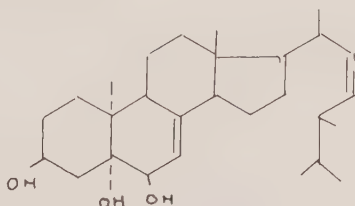
F : 162° [α] D : + 42°

STEROLS COMMUNS AUX BASIDIOMYCETES ET AUX ASCOMYCETES



Ergostérol

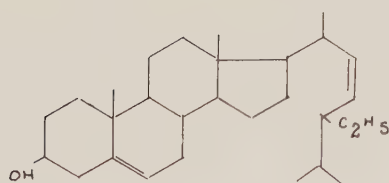
F : 165° [α] D : — 130°



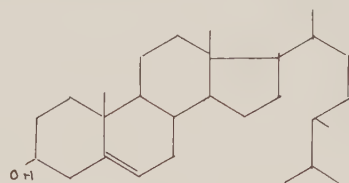
Cérévistérol

F : 256° [α] D : — 83°

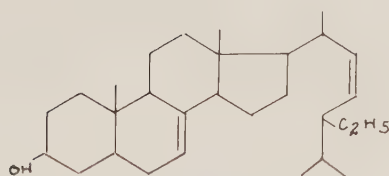
STEROLS COMMUNS AUX BASIDIOMYCETES ET AUX PHANEROGAMES



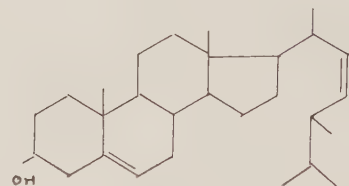
Stigmasterol
F : 170° [α] D : — 51°



Campesterol
F : 158° [α] D : — 33°



Spinasterol
F : 172° [α] D : — 4°



Brassicasterol
F : 148° [α] D : — 64°

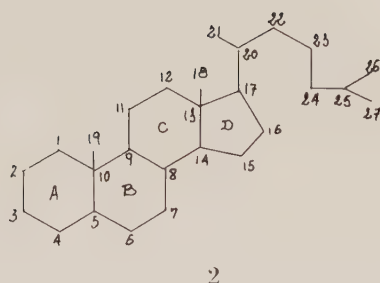
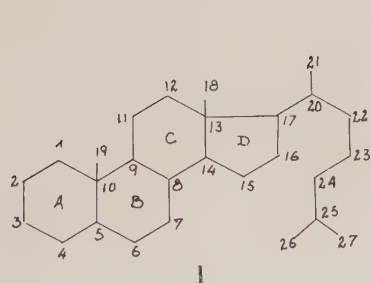
Ergostérol

Il faut en effet remarquer que sur les six stérols isolés des Basidiomycètes, cinq se retrouvent chez les Phanérogames, souvent en quantité plus importante. Ainsi le brassicastérol et le campestérol sont très fréquents chez les Crucifères : le stigmasterol découvert dans la fève de Calabar (Légumineuses) se trouve très souvent dans d'autres plantes supérieures, en particulier dans les Rubiacées, les Solanacées, les Cactées et le pollen de nombreuses plantes. Le spinastérol a été isolé des Légumineuses, des Ombellifères, des Scrofulariacées et des Chénopodiacées. Par contre, le β sitostérol qui est extrêmement répandu chez toutes les plantes supérieures, en particulier dans les Rosacées et les Crucifères (72), (25), n'a jamais été signalé dans les champignons.

Isomérisie des stérols.

Plusieurs modes de représentation des stéroïdes ont été successivement utilisés.

D'après la nouvelle nomenclature officielle (48), (19) on doit utiliser la représentation de la formule 2.



Nous rappellerons brièvement quelques définitions de stéréochimie.

Les atomes d'une structure organique classique peuvent avoir, dans l'espace, plusieurs positions. Celles-ci sont illustrées par les conformations « chaise » et « bateau » du noyau cyclohexane (69).



Chaise



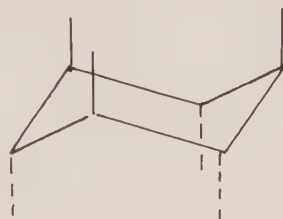
Bateau

Les formes « bateau », instables, se rencontrent rarement chez les stéroïdes.

De plus, les valences des six atomes de carbone du noyau cyclohexane peuvent se répartir en deux catégories. Les « valences équatoriales » qui se trouvent dans le plan du cycle et les « valences axiales » qui sont perpendiculaires au plan du cycle.



Valences équatoriales



Valences axiales

* Au Bulletin de la Société Chimique de France, de mai 1967, paru en juin 1967, une publication de A. GAUDEMER, J. POLONSKY et R. GMELIN traite de la structure de l'acide tyromycique. Ce nouvel acide triterpénique, retiré d'un polypore, peut être rattaché au dihydro-agnostérol. Comme les autres triterpènes isolés des champignons il s'agit donc d'un triterpène tétracyclique (38).

RECHERCHES
PERSONNELLES

CHAPITRE PREMIER

RÉCOLTE - SÉCHAGE - EXTRACTION

RECOLTE

La récolte des champignons est compliquée par le fait qu'elle ne peut se faire que pendant un temps restreint et, certaines années, par suite de conditions météorologiques défavorables, on n'en trouve que de très faibles quantités, parfois même la récolte est nulle. D'autre part, les champignons d'une espèce ont souvent une aire de distribution géographique assez limitée. Dans une même région, il arrive fréquemment qu'ils se développent uniquement dans certains périmètres particuliers et, même dans les régions favorisées, cette récolte ne peut se faire que pendant deux à trois mois par an en général.

Le plus grand nombre d'espèces fructifient en automne, tous les champignons que nous avons étudiés apparaissent assez tardivement. Le *Tricholome prétentieux* et le *Tricholome équestre*, en particulier, sont surtout abondants à partir du 15 octobre et on les trouve même en quantités importantes juste avant les premières gelées. Le gros inconvénient est qu'à cette période la teneur en eau des champignons est très importante et ils sont pratiquement toujours récoltés très humides, ce qui complique notablement le séchage.

Or, il est nécessaire qu'un séchage, au moins grossier, soit effectué rapidement si on veut éviter la décomposition. Ces champignons sont en effet riches en enzymes provoquant une altération rapide. Nous avons personnellement constaté dans certains cas, où nous avions fait un séchage insuffisamment rapide, une diminution notable des

rendements en divers constituants. Dans un cas, il nous a même été impossible de retrouver le stérol qui caractérise le *Tricholome* pré-tentieux.

En pratique, nous avons opéré de la façon suivante :

Dans les vingt-quatre à quarante-huit heures qui suivent la récolte, suivant l'humidité des échantillons, les champignons sont débarrassés soigneusement des substances étrangères : terre, feuilles, aiguilles de pin. Nous les avons ensuite séchés en utilisant plusieurs procédés.

SECHAGE

En raison des faibles rendements en matière sèche et de la courte durée du temps de la récolte, nous avons dû sécher à la fois des quantités importantes de champignons frais.

Pour des raisons pratiques nous avons eu l'occasion d'employer souvent simultanément, pour des champignons provenant d'un même lot, plusieurs méthodes de séchage. Ceci nous a permis de bien juger la valeur des différentes méthodes et de vérifier l'importance d'un séchage soigné.

Première méthode : séchage à l'air libre.

Cette méthode est évidemment la plus simple mais elle ne convient bien que pour des échantillons jeunes ne risquant pas de se décomposer trop rapidement. D'autre part, il est indispensable de couper les champignons en tranches de un demi à un centimètre d'épaisseur. Nous avons constaté qu'un fractionnement en tranches plus fines provoquait un départ trop rapide d'eau favorisant la décomposition des échantillons. Un broyage des champignons frais rend impossible le séchage normal et la composition chimique est profondément modifiée.

Les fragments de champignons sont étalés sur des feuilles de papier filtre dans une pièce bien ventilée, à une température de 20° environ. Ils sont retournés deux à trois fois par jour pendant trois à quatre jours. A ce stade, la majeure partie de l'eau a été éliminée et la dessiccation est terminée à l'étuve sous vide phosphorique.

Il est très important que les champignons ne soient pas soumis à une température trop élevée. En effet, si la dessiccation est terminée dans une étuve à 100°, il se produit une résinification qui provoque l'adsorption des produits importants. Il est ensuite difficile de les isoler et les rendements sont très inférieurs.

Deuxième méthode : séchage à basse température.

Afin de sécher les champignons en altérant le moins possible leur composition chimique nous avons effectué certaines dessiccations au réfrigérateur à une température de 2 à 6°. Ce mode de séchage convient surtout pour des champignons en bon état. Il est long mais il a l'avantage de permettre une dessiccation poussée en respectant intégralement la structure des tissus. Les rendements obtenus en divers constituants sont, dans ce cas, maximum.

Les champignons sont étalés en couches de deux à quatre centimètres d'épaisseur et ils sont retournés tous les deux ou trois jours. On doit avoir soin de les placer le plus près possible de la source froide de manière à faciliter la congélation de l'eau qui s'évapore. La dessiccation demande au minimum un mois.

Troisième méthode : séchage à haute température dans un four à haute fréquence.

En raison, d'une part, des quantités importantes de champignons que nous avons dû sécher, et, d'autre part, en raison de leur altération rapide, il était souhaitable d'utiliser un procédé permettant de sécher de grandes quantités en un temps court.

Nous avons remarqué que, lorsque les champignons avaient perdu environ 50 % de l'eau qu'ils contenaient, le séchage à l'air libre s'effectuait rapidement. Comme nous ne disposions pas au laboratoire d'une installation permettant le séchage dans un courant d'air chaud, nous avons fait des essais de séchage dans un four à haute fréquence.

Le chauffage par pertes diélectriques hyperfréquentielles présente divers avantages sur les moyens traditionnels de chauffage qui utilisent la conduction et le rayonnement.

Dans le chauffage par conduction la température du corps est notablement plus élevée à la surface qu'à l'intérieur. Il se produit des phénomènes de croûtage qui s'opposent au départ de l'eau contenue dans les couches internes. Pour y remédier, il est nécessaire de chauffer très lentement. Or, les champignons sont particulièrement riches en enzymes et une élévation lente de température provoque des altérations importantes.

Dans le chauffage par rayonnement on utilise surtout une source de rayonnement infra-rouge. L'homogénéité de température du corps à chauffer est plus grande que dans le cas du chauffage par conduction, mais il se produit cependant des phénomènes de croûtage. La montée en température est insuffisamment rapide pour stabiliser la substance à sécher.

Le chauffage par pertes diélectriques hyperfréquentielles présente les avantages de chauffer sans contact et presque instantanément. Dans ce mode de chauffage les tissus végétaux ne constituent pas un

matériau isolant. On a donc une parfaite homogénéité de température dans l'ensemble des tissus. Nous avons vérifié, qu'entre la surface du champignon et l'intérieur, la différence de température n'excédait pas 2°. D'autre part, contrairement à tous les autres modes de chauffage, ce sont les parties internes qui sont légèrement plus chauffées que l'extérieur. Ceci s'explique aisément puisque la température de chauffage, dans ce procédé, est d'autant plus élevée que l'organe contient plus d'eau. Il est évident que la teneur en eau d'une plante est toujours plus grande à l'intérieur qu'à l'extérieur. Ce phénomène facilite le départ d'eau.

Nous décrivons brièvement le four utilisé :

On peut distinguer deux parties :

1) La source d'énergie hyperfréquentielle comprenant les magnétrons, les alimentations, les circuits de régulation et les guides de distribution d'énergie.

2) La cavité d'utilisation. Cette cavité comportait une ouverture permettant l'évacuation de l'air humide grâce à un ventilateur. Pour éviter les pertes d'énergie par l'ajustage de la porte, on utilise des pièges métalliques qui forment des courts-circuits hyperfréquentiels.

Nous avons opéré avec un four dont les dimensions de la chambre étaient les suivantes : hauteur 70 cm, profondeur 50 cm, largeur 50 cm. La puissance du magnétron était de 2 Kw. Le rendement énergétique du magnétron varie suivant le mode d'utilisation et selon la fréquence utilisée. Afin de ne pas gêner les autres utilisateurs d'hyperfréquence, quatre fréquences ont été réservées pour le chauffage industriel. Ces fréquences sont les suivantes :

Bande A	915 MHz
Bande B	2.450 MHz
Bande C	5.800 MHz
Bande D	22.125 MHz

Seules les Bandes A, B et C sont utilisées en pratique, elles donnent respectivement des rendements de 80, 65 et 50 %. Le four que nous avons à notre disposition possédait un magnétron utilisant la Bande B. Compte-tenu des pertes diverses, le rendement énergétique du magnétron était de 50 %.

Pour assurer une homogénéité parfaite du chauffage, les corps à traiter sont placés sur une plate-forme tournante située à la partie inférieure de la cavité.

A titre d'indication, signalons qu'un litre d'eau à 20° placé dans l'appareil est porté à l'ébullition en trois à quatre minutes.

Nous n'avons pas effectué, par ce procédé, un séchage complet des champignons. En effet, il n'est pas possible, au bout de quelques minutes, de maintenir la température au-dessous de 100°, ce qui aurait

évidemment provoqué la destruction des divers constituants. Ce traitement nous a permis d'éliminer une partie de l'eau et, surtout, de stabiliser les champignons, ce qui facilitait beaucoup le séchage à l'air libre. N'ayant disposé de ce four que pendant un temps restreint, nous avons pu seulement traiter ainsi environ 30 kg de champignons.

Nous avons vu qu'en raison de la faible durée de la récolte il était nécessaire de sécher à la fois des lots importants représentant plusieurs dizaines de kilogrammes de champignons. Afin d'essayer d'échelonner les traitements nous les avons soumis à la *congélation* aux environs de -30° .

Il est connu que les champignons se prêtent très mal à la conservation par le froid. A la décongélation il se produit un ramollissement des tissus.

Ce procédé nous a permis une conservation parfaite des échantillons. Nous avons vérifié qu'après deux ans la composition chimique était demeurée inchangée. Il est nécessaire de les sécher le plus rapidement possible après les avoir sortis du congélateur en raison de la liquéfaction qui entraînerait une action rapide des enzymes.

Pour cette raison les échantillons congelés ont d'abord été séchés partiellement au four à haute fréquence.

Dès la récolte les champignons sont placés, en couches de 6 à 8 centimètres d'épaisseur, dans un congélateur à une température de -28 à -30° . Au moment de l'utilisation, après avoir été dégelés une à deux heures à la température du laboratoire, les champignons sont séchés dans un four à haute fréquence. La dessiccation est ensuite terminée à l'air libre.

Nous avons également essayé de débarrasser les champignons congelés de la majeure partie de leur eau en les pressant à la presse à vis.

On opère de la manière suivante : les champignons sont mis directement dans la presse sans décongélation ; peu à peu le jus s'écoule et on obtient une partie liquide et un résidu solide. Le résidu solide est séché en couches minces à l'air libre puis à l'étuve à 50° . La partie liquide est distillée sous vide à température de 50° .

Cette variante donne de bons résultats au point de vue de la conservation des différents constituants, mais elle est longue en raison de la quantité importante d'eau à distiller et des difficultés de pressage.

Séchage industriel.

En raison des quantités très importantes de *Tricholome* prétentieux que nous avons utilisées, de l'ordre de plusieurs centaines de kilogrammes, nous avons dû employer des séchoirs industriels. Environ 400 kg de champignons ont été séchés selon ce procédé.

Nous avons utilisé des séchoirs classiques. Ils sont constitués par des claies en bois superposées et le séchage est fait grâce à une circulation d'air chauffé à une température de 40 à 50°.

En raison de l'épaisseur de la couche de champignons, qui atteint 7 à 10 centimètres, il est nécessaire d'opérer rapidement pour éviter toute altération. Lorsque le séchage des champignons est effectué en vue de leur consommation on fait une désinfection préalable par du bromure de méthyle. Pour éviter une modification éventuelle de la composition chimique nous n'avons pas soumis les champignons au traitement par le bromure de méthyle. En augmentant le débit d'air chaud il nous a été possible de sécher les champignons sans altération apparente.

Nous avons utilisé la méthode du séchage à air libre avec des lots très divers. C'est pourquoi nous donnerons ci-dessous des rendements obtenus avec cette méthode.

Les différents modes de séchage que nous avons utilisés donnent des produits d'une qualité à peu près identique. Il nous semble que seuls interviennent l'époque de la récolte et l'état dans lequel se trouve le champignon au moment du séchage. Nous avons isolé un plus grand nombre de substances chimiques définies à partir des lots où prédominaient les exemplaires jeunes.

Selon les quantités à sécher, on peut donc utiliser l'un ou l'autre procédé.

Rendements en substance sèche.

Un lot de 170 kg de *Tricholome prétentieux* frais, en très bon état, nous a fourni 12.5 kg de champignons secs. 70 kg de *Tricholome équestre* de très bonne qualité nous ont donné 7 kg de champignons secs.

Les rendements varient relativement peu suivant les lots. Récoltés après une pluie les champignons semblent retenir beaucoup d'eau et on s'attendrait à une chute notable du rendement en substance sèche. D'autre part, on admet généralement que les lots où prédominent les spécimens plus mûrs et plus gros contiennent une proportion d'eau plus importante.

Cependant nous avons toujours obtenu une teneur en matière sèche comprise entre 7 et 8.5 % du poids du champignon frais pour le *Tricholome prétentieux*, et de l'ordre de 10 à 11 % pour le *Tricholome équestre*. La teneur en eau varie donc peu.

EXTRACTION

Les champignons sont réduits en poudre au broyeur à étoiles de manière à obtenir une poudre demi-fine, c'est-à-dire passant au tamis module 26.

Pour les échantillons dont nous ne possédions qu'une faible quantité, de l'ordre de 20 à 300 g. le broyage a été effectué au mixer.

Avant extraction on laisse gonfler la poudre dans le solvant choisi pendant quelques heures avant de procéder à l'extraction proprement dite.

Choix du solvant.

Dans tous les cas on a effectué deux extractions successives, la première avec un solvant hydrocarboné, la seconde avec un alcool. Une seule extraction par un alcool suffirait pour extraire la totalité des constituants, mais la séparation des différents produits est facilitée par une extraction préalable par un hydrocarbure. La reprise du résidu alcoolique d'extraction par un solvant tel que le benzène, par exemple, est très longue en raison de la nature résineuse de l'extrait. D'autre part, certains corps fragiles sont altérés lors de l'extraction en milieu alcoolique. Cette décomposition est particulièrement nette pour un nouveau stérol extrait du *Tricholome prétentieux*.

Pour la première extraction nous avons utilisé tout d'abord l'éther de pétrole. L'éther de pétrole permet seulement d'extraire les corps gras, les carbures et des traces de stérol. Par la suite, on a préféré utiliser le benzène qui extrait, non seulement les corps gras et les carbures, mais la majorité des stérols.

Après les extractions benzéniques nous avons effectué des extractions par l'éthanol ou le méthanol. Ces deux solvants donnent des résultats pratiquement identiques, l'éthanol permet une extraction un peu plus rapide mais est plus long à éliminer.

Technique d'extraction.

Les extractions par le benzène ont été effectuées soit à froid par percolation, soit à chaud dans un extracteur du type Kumagawa. Dans les cas où nous disposions que d'une faible quantité de matière première, c'est-à-dire moins de 300 g, l'extraction a été effectuée au Soxhlet.

Pour tous les constituants du *Tricholome équestre* et la plupart de ceux du *Tricholome prétentieux* les rendements sont identiques, que l'extraction soit faite à chaud ou à froid. Par contre, pour isoler le nouveau stérol du *Tricholome prétentieux*, nous avons dû opérer par percolation, l'extraction à chaud ne permettant d'obtenir que des traces de ce corps.

Il ne nous a pas été possible de trouver une explication satisfaisante pour ce phénomène. En effet le nouveau stérol que nous avons isolé du *Tricholome prétentieux* n'est pas altéré par chauffage dans le benzène à l'ébullition. On ne peut donc pas penser qu'il est détruit lors de l'extraction à chaud.

Dans le cas du *Tricholome prétentieux* nous avons donc dû effectuer une percolation. Cette méthode a l'inconvénient d'être très longue et de nécessiter la distillation de quantités très importantes de solvant.

On opère selon la technique classique. Dans le percolateur on introduit 3 kg de poudre de *Tricholome prétentieux* et, après addition du benzène, on laisse en contact 12 heures avant de poursuivre la percolation. L'extraction totale demande environ 14 jours et nécessite l'emploi de 120 l de benzène. On obtient un résidu pesant 145 g.

Les extractions alcooliques ont toujours été effectuées à chaud. Des essais préliminaires nous ont montré que les différents corps extraits à l'alcool ne subissaient ainsi aucune altération. On utilise environ 5 l d'alcool pour 1 kg de poudre.

Pour les *Tricholomes* autres que le *Tricholome prétentieux*, l'extraction benzénique a été effectuée à chaud. Dans la plupart des cas 12 heures d'extraction sont suffisantes et on utilise seulement 5 l de solvant pour 1 kg de poudre.

Cependant on doit faire une restriction pour le cas de l'ergostérol. En effet, même après une extraction beaucoup plus longue, il ne nous a pas été possible de l'extraire totalement. Au bout de 36 heures le résidu du benzène d'extraction était pratiquement négligeable et donnait une réaction de Liebermann totalement négative. En raison de la solubilité de l'ergostérol dans le benzène à chaud on pouvait donc penser que la totalité de l'ergostérol avait été extraite. Il n'en était rien puisque, lors du traitement ultérieur par l'alcool, on extrayait une quantité notable d'ergostérol.

On avait pensé tout d'abord que cela provenait d'une extraction irrégulière par le solvant. Afin de supprimer cette cause d'erreur nous avons vidé et rempli à nouveau à plusieurs reprises le panier d'extraction pour permettre un bon contact de toute la poudre avec le solvant. Des extractions ultérieures par le benzène ne nous ont pas permis d'isoler la moindre trace d'ergostérol. On peut donc envisager l'hypothèse selon laquelle une partie de l'ergostérol serait associée dans la plante sous forme d'une combinaison qui ne se dissocierait que sous l'action d'un solvant alcoolique.

Les résidus des extractions alcooliques sont très visqueux, ce qui est dû en partie à la présence de sucres. Pour faciliter la séparation des corps cristallisés, et en particulier de l'ergostérol, il a été nécessaire de les soumettre à la fermentation par les levures.

CHAPITRE II

TRICHOLOME PRÉTENTIEUX

ISOLEMENT DES DIFFÉRENTS CONSTITUANTS

Des essais préliminaires nous ont montré la présence de stérols dans les extraits benzéniques et alcooliques obtenus à partir du Tricholome prétentieux. Nous nous sommes attachés à isoler et à purifier les composés stéroïdiques contenus dans ces extraits. Au cours de cet isolement nous avons été amenés à séparer d'autres constituants : des dérivés de l'acide palmitique, des sucres et du mannitol, des acides aminés, du soufre et un composé fondant à 103°.

Nous avons pu séparer deux stérols, l'ergostérol et un nouveau stérol du même groupe : le portenstérol. La séparation est assez délicate en raison des propriétés très voisines de ces corps. Nous avons largement utilisé la chromatographie sur colonne en faisant surtout varier les quantités d'adsorbant et en utilisant des mélanges de solvants.

Au cours des chromatographies l'ergostérol est toujours élué au benzène lorsque nous opérons sur un poids d'alumine inférieur ou égal à 10 fois le poids de l'extrait ou sur 15 fois le poids de Florisil. Il est élué à l'éther lorsque nous employons un poids d'alumine égal ou supérieur à 15 fois le poids de l'extrait.

Par contre, l'élution de l'autre stérol nécessite l'emploi d'un mélange d'éther et de 10 % au minimum de solvant alcoolique, quelles que soient la nature de l'adsorbant et les proportions utilisées.

Les autres constituants ont été isolés par cristallisation et par chromatographie.

ISOLEMENT DES STEROLS

ERGOSTEROL

Comme nous l'avons signalé dans le chapitre consacré à l'extraction, nous avons isolé l'ergostérol de deux fractions différentes. La quantité la plus importante est obtenue par extraction au benzène, le rendement est environ de 360 mg par kg de champignons secs. Par extraction alcoolique on en retire encore 260 à 320 mg que l'on isole soit par traitement au benzène de l'extrait alcoolique, soit après fermentation de cet extrait.

La teneur totale en ergostérol du *Tricholome* prétentieux est donc d'environ 500 à 700 mg par kg de champignons secs.

Dans tous les cas l'ergostérol a été obtenu pur par chromatographie sur colonne.

Nous avons signalé que l'ergostérol s'élue beaucoup plus facilement que l'autre stérol, ceci est normal en raison de sa constitution chimique. Nous verrons, en effet, que ce stérol original possède deux hydroxyles, sa polarité est donc plus grande et il est normal qu'il faille utiliser pour l'éluer un mélange éthéro-alcoolique.

Pour isoler l'ergostérol du résidu d'extraction par le benzène à chaud nous avons utilisé trois méthodes :

- 1) Chromatographie du résidu sur 12 fois son poids d'alumine.
- 2) Purification du résidu par passage sur alumine, suivie d'une saponification des corps gras.
- 3) Elimination préalable des corps gras, suivie de cristallisations.

Ces méthodes présentent chacune des avantages. La première permet d'obtenir directement des produits plus purs, la deuxième est plus rapide, mais seule la troisième permet d'obtenir les acides gras.

1) Chromatographie du résidu d'extraction sur 12 fois son poids d'alumine.

Partant de 2,5 kg de poudre nous avons obtenu 121 g d'extrait qui est chromatographié, en solution benzénique, sur 1.450 g d'alumine.

- L'élution par 16 l de benzène donne un résidu pesant 18,8 g.
- L'élution par 12 l d'éther fournit un résidu pesant 28,5 g.
- Les résidus obtenus par élution avec 10 l d'éthanol puis avec 20 l de méthanol sont mélangés. L'ensemble a une constitution visqueuse et pèse environ 40 g. Ce résidu est fortement odorant et par séchage il part des corps volatils.

Dans les premiers essais nous avons vérifié que l'élution à l'eau acide ne donnait aucun produit défini. Nous avons donc ensuite abandonné la chromatographie après élution par le méthanol.

De la fraction éluee à l'éthanol nous avons retiré quelques milligrammes de portenstérol très impur.

L'éluat à l'éther est chromatographié à nouveau sur 20 fois son poids d'alumine. Par élution à l'éther on recueille environ 100 mg d'ergostérol.

Le résidu de l'éluat au benzène est dissous dans l'éther de pétrole et chromatographié sur 20 fois son poids d'alumine :

- L'élution par 3 l d'éther de pétrole donne un résidu négligeable constitué par des traces de carbure.

- L'élution par 7 l de benzène laisse un résidu huileux jaune pâle dans lequel cristallise le soufre.

- L'élution par 5 l d'éther donne un résidu pesant 6,55 g, à partir duquel cristallise 800 mg d'ergostérol brut.

- L'élution par 5 l d'éthanol puis par 8 l de méthanol laisse un mélange renfermant des graisses.

2) *Purification par passage sur alumine, suivie d'une saponification des corps gras.*

Cette chromatographie sur alumine est faite en utilisant seulement comme poids d'alumine 8 fois celui du résidu. Des essais préliminaires nous avaient montré que, si on effectuait cette chromatographie en solution benzénique, l'élution de l'ergostérol était très longue et qu'il n'était pas plus pur que lorsqu'on opérait avec de l'éther.

A partir de 67 g d'extrait on utilise 25 l d'éther. Par concentration de la solution étherée celle-ci abandonne 20 à 40 mg de cristaux d'ergostérol. Mais pour isoler la majeure partie de l'ergostérol contenu dans le résidu d'élution à l'éther il est nécessaire d'effectuer une saponification des corps gras mélangés à l'ergostérol.

Cette saponification est faite en solution alcoolique de soude à 10 %, par chauffage pendant deux heures au bain-marie bouillant. Après saponification, élimination de l'alcool et remplacement par de l'eau, l'extraction à l'éther permet d'isoler 430 mg d'ergostérol. Nous avons vérifié que le traitement à l'éther permettait bien d'extraire la totalité de l'ergostérol.

Cette méthode permet d'isoler assez facilement et pratiquement quantitativement l'ergostérol, mais elle ne permet pas d'isoler les corps gras et les petites quantités de portenstérol présentes dans l'extrait.

3) Séparation par cristallisation après élimination des corps gras.

En effectuant directement la saponification sur l'extrait par une solution de soude alcoolique à 3 % nous débarrassons l'extrait de la totalité des corps gras. Après traitement comme précédemment nous isolons l'ergostérol.

La solution basique acidifiée laisse précipiter les acides gras que l'on extrait à l'éther.

Par cette méthode on sépare correctement l'ergostérol, mais on isole seulement les acides gras et non les corps gras, on perd aussi les petites quantités de portenstérol contenues dans l'extrait.

En résumé, la chromatographie directe de l'extrait sur 12 fois son poids d'alumine constitue la meilleure méthode d'analyse.

PORTENSTEROL

Rappelons que la percolation par le benzène à froid constitue la méthode qui permet d'isoler le portenstérol avec le rendement maximum.

Après élimination du benzène sous pression réduite, le résidu obtenu est chromatographié tout d'abord en solution benzénique sur 15 fois son poids d'alumine. On effectue l'élution successivement par le benzène, l'éther puis l'éthanol.

Voici un exemple chiffré de chromatographie :

Partant d'un poids d'extrait de 145 g on obtient les fractions suivantes :

- 4 l de benzène donnent des résines pesant quelques milligrammes.

- 58 l d'éther donnent 4,97 g d'un résidu huileux dans lequel cristallise un peu d'ergostérol.

- 54 l d'éthanol laissent un résidu brun pesant 31,4 g.

La presque totalité de l'ergostérol présent dans la fraction éluee à l'éther cristallise par refroidissement. Il ne nous a pas été possible d'isoler d'autres composés définis de cette fraction.

Les 31,4 g provenant de la fraction alcoolique sont chromatographiés à nouveau sur 25 fois leur poids d'alumine, soit sur 785 g d'alumine. Cette fraction étant entièrement soluble dans l'éther nous effectuons cette deuxième chromatographie en solution étherée. On effectue l'élution de la manière suivante :

- 14 l d'éther éluent quelques centaines de milligrammes d'huile.

- 4 l d'éther à 10 % d'éthanol laissent un résidu huileux forte-

ment coloré en rouge brun, donnant une réaction de Liebermann négative.

- 10 l d'éther à 10 % d'éthanol fournissent environ 200 mg d'un résidu solide. Par cristallisation de l'éthanol on obtient le portenstérol.

Il est indispensable d'effectuer les chromatographies dans un laps de temps aussi court que possible après l'extraction. Ceci est particulièrement valable pour la première chromatographie. Après un séjour de l'extrait de deux à trois semaines à la température du laboratoire on isole seulement des traces de portenstérol. On peut penser qu'il s'est produit une polymérisation des résines et que les produits formés, adsorbant le portenstérol, rendent pratiquement impossible sa cristallisation.

Les 200 mg de portenstérol obtenus à partir d'un résidu pesant 145 g représentent une teneur d'environ 65 mg par kg de champignons secs. Il convient de noter qu'une petite quantité de portenstérol, de l'ordre de 10 mg par kg de champignons secs, passe dans le benzène lors de la reprise par ce solvant de l'extrait alcoolique.

Le portenstérol est isolé de cette fraction benzénique en utilisant la méthode ci-dessus. Comme précédemment, le portenstérol est élu par de l'éther à 10 % d'éthanol.

La teneur en portenstérol d'un kg de champignons secs est donc environ de 75 mg.

ISOLEMENT DES PALMITATES

ET DES ACIDES AMINES

Le sel de potassium et le sel de sodium de l'acide palmitique, ainsi que les acides aminés, sont isolés à partir de la solution alcoolique obtenue par extraction à chaud.

Les sels d'acide palmitique sont séparés par chromatographies de l'extrait alcoolique directement ou après élimination des sucres par fermentation.

Pour isoler les acides aminés il est nécessaire d'éliminer les sucres par fermentation.

Il convient tout d'abord de souligner une différence nette de solubilité entre le sel de potassium de l'acide palmitique et le sel de sodium de ce même acide. Le premier est soluble dans le benzène, le second est pratiquement insoluble dans ce solvant. Cette différence

de solubilité est surprenante. On peut émettre l'hypothèse que le sel de sodium de l'acide palmitique existe sous forme d'un complexe insoluble dans le benzène et qui est détruit par fermentation. En effet, ce sel de sodium, après isolement, possède une légère solubilité dans le benzène.

Après reprise de l'extrait alcoolique au benzène le résidu obtenu est chromatographié, en solution benzénique, sur 15 fois le poids d'alumine. La reprise par le benzène est longue et nécessite une quinzaine de traitements.

Rappelons que l'on isole de la fraction éluee à l'éther l'ergostérol, l'élution par l'éther à 10 % d'éthanol permet de séparer un peu de portenstérol, et l'éluat à l'alcool renferme le sel de potassium de l'acide palmitique.

Cette solution éthanolique, traitée par le noir animal, laisse cristalliser le sel de potassium pur avec un rendement de 100 mg environ par kg de champignons secs.

Le résidu de l'extraction alcoolique, insoluble dans le benzène, est repris par l'eau puis soumis à la fermentation par les levures.

On opère à une concentration de 10 %. On emploie un excès de levures, par exemple, pour 100 g de résidu, correspondant à 350 g de champignons secs, on utilise la quantité de levures nécessaire à la vinification d'un demi-hecto de jus de raisin. On laisse la fermentation s'effectuer pendant 21 jours pendant lesquels on agite plusieurs fois par jour. Après filtration, le résidu insoluble est séché, repris par l'éther de pétrole, puis chromatographié sur 12 fois son poids de Florisil 60/100 mesh.

Rappelons que, par élution au benzène, on isole une autre quantité d'ergostérol et, de l'éluat à l'éthanol, on retire le sel de sodium de l'acide palmitique avec un rendement de 50 à 60 mg par kg de champignons secs.

Les acides aminés restent en solution aqueuse après fermentation. C'est à partir de cette solution, concentrée, que nous les avons caractérisés par chromatographie.

ISOLEMENT DU MANNITOL

La teneur en mannitol a varié assez sensiblement selon les lots. Avec les échantillons les plus riches on isole une partie de celui-ci, à partir de la solution éthanolique d'extraction, par simple concentration. Dans les cas où la teneur en mannitol est faible il est nécessaire de purifier l'extrait alcoolique pour obtenir la cristallisation.

Cette purification est effectuée successivement par trois opérations. Après traitement au benzène le résidu insoluble est dissous dans l'eau, puis déféqué par l'acétate basique de plomb. Après filtration, l'excès d'acétate de plomb est éliminé partiellement par une solution d'acide sulfurique au 1/10^e puis totalement par un courant d'H₂S. La solution est évaporée et le résidu, repris par l'éthanol, est traité au noir animal. Par chromatographie sur 15 fois le poids d'alumine on élue le mannitol à l'éthanol. La teneur en mannitol varie de 1 g à 10 g par kg de champignons secs.

ISOLEMENT D'UN PIGMENT ET D'UN CORPS FONDANT A 103°

A partir de l'extrait benzénique d'extraction à chaud nous avons retiré un pigment et un produit nettement cristallisé fondant à 103°.

Cet extrait benzénique, chromatographié sur alumine ou sur Florisil, colore l'adsorbant en violet mauve intense. Cette coloration est particulièrement visible après élimination des corps élués au benzène et à l'éther. Il n'est pas possible d'éluer ce pigment par un solvant ni par des solutions aqueuses acides ou basiques.

Nous l'avons extrait par traitement de l'adsorbant par chauffage au bain-marie bouillant avec les alcools amylique ou propylique en milieu chlorhydrique. On peut également extraire ce pigment par chauffage avec une solution aqueuse de soude à 5 %.

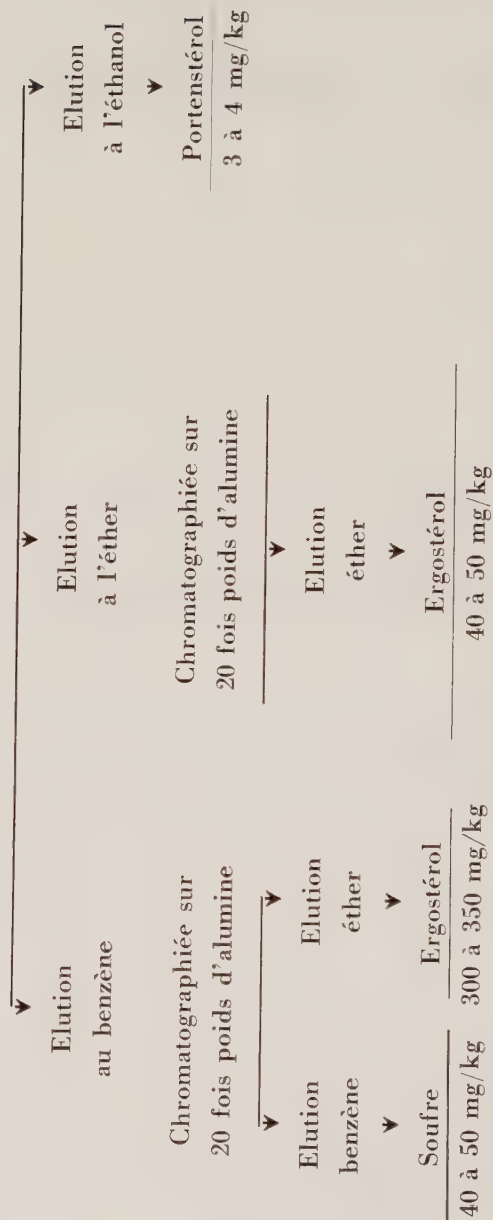
Le pigment obtenu, après élimination des solvants, est rouge vif en milieu alcalin et jaune en milieu acide. Il ne présente pas d'absorption dans l'U.V., mais les faibles quantités que nous avons obtenues ne nous ont pas permis d'entreprendre son étude. Nous pensons l'effectuer lors de recherches ultérieures.

Lorsque nous effectuons la chromatographie de l'extrait benzénique, obtenu par extraction à chaud, sur Florisil 60/100 mesh, nous obtenons, par élution à l'éther, un produit fondant à 103°. Ce corps cristallise à partir du résidu huileux avec un rendement d'environ 100 mg par kg de champignons secs. Il est curieux de constater qu'il nous a été impossible de l'isoler à partir des différentes fractions lorsque la chromatographie est effectuée sur alumine.

Comme pour le pigment, nous pensons entreprendre son étude ultérieurement.

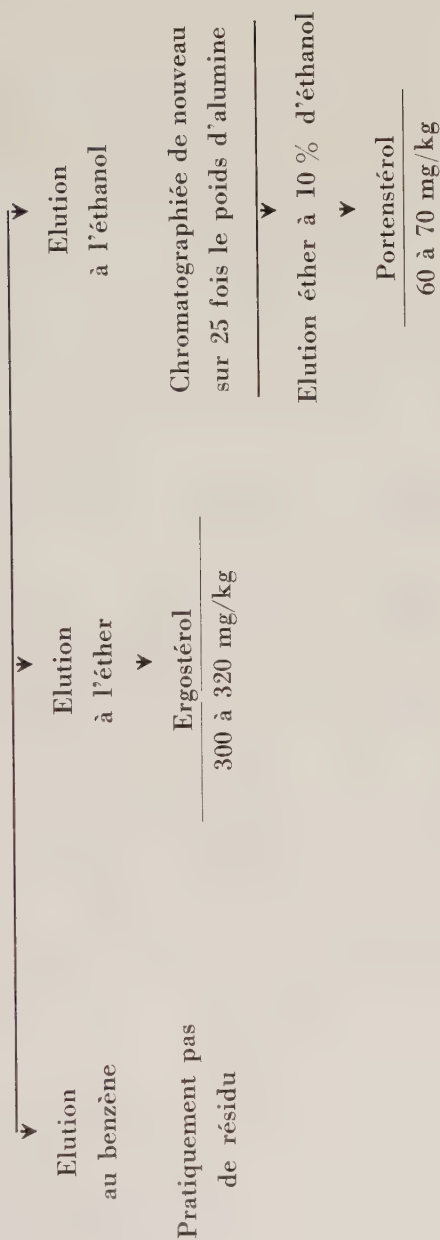
EXTRACTION PAR LE BENZÈNE A CHAUD

*Suivie d'une chromatographie du résidu
sur 12 fois le poids d'alumine*



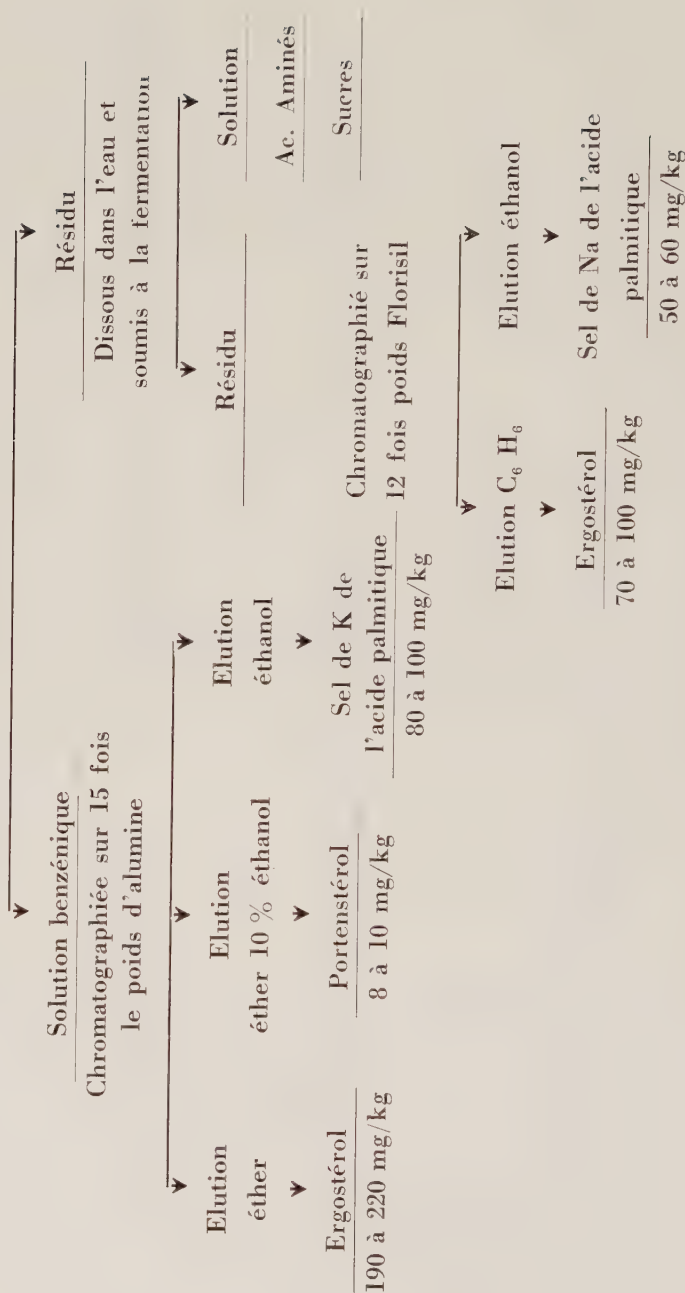
PERCOLATION AU BENZÈNE

*Suivie d'une chromatographie du résidu
sur 15 fois le poids d'alumine*



EXTRACTION ALCOOLIQUE A CHAUD

Reprise du résidu au benzène



E R G O S T É R O L

I. — L'ERGOSTEROL DANS LES CHAMPIGNONS.

L'ergostérol a été découvert dans l'ergot de seigle par TANRET en 1889 (83). Depuis, l'étude de sa structure et de son action physiologique en tant que provitamine D a fait l'objet de nombreux travaux, en particulier ceux de WINDAUS et de ses collaborateurs (29).

Actuellement, cette étude se poursuit tant à l'aide des nouvelles méthodes physiques d'investigation dont disposent les chercheurs que par des réactions chimiques effectuées sur sa molécule et ses dérivés (37).

La présence d'ergostérol a été mise en évidence dans un certain nombre de champignons.

En 1912, GORIS et MASCRÉ (42) l'ont extrait de *Collybia maculata*, *Craterellus cornucopioides*, *Hydnum repandum*, *Psalliota campestris*, et de plusieurs *Tricholomes* : *Tricholoma album*, *georgii*, *pesundatum* et *terreum*.

IKEGUCHI (46) avait aussi isolé, de quatre champignons : *Collybia shiitake*, *Armillaria edodes*, *Hydnum aspartum* et *Lycoperdon gemmatum*, un stérol qu'il avait nommé mycostérol et qui s'est révélé ultérieurement identique à l'ergostérol (79).

Plus récemment l'ergostérol a été isolé dans plusieurs *Lactaires* : *Clitocybe illudens* : *Polyporus betulinus*, *officinalis* et *pinicola* : *Phallus impudicus* et *Boletus satanas*.

Nous voyons que le nombre de *Basidiomycètes* chez lesquels on avait signalé la présence d'ergostérol était relativement restreint.

L'ergostérol a été isolé en quantités importantes chez les *Ascomycètes*. On sait qu'il est un constituant général des levures.

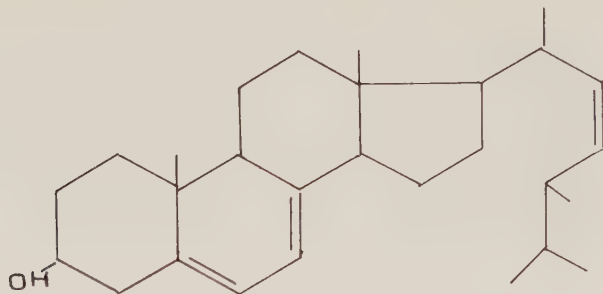
Sa présence a été signalée dans le règne végétal comme dans le règne animal. Citons les algues, les bactéries, divers tissus animaux, les mollusques et les embryons. Par contre, il a été rarement trouvé chez les *Phanérogames*.

II. — PARTIE THEORIQUE.

Un des stérols que nous avons extraits du *Tricholome* prétentieux s'est révélé être de l'ergostérol. Ce champignon en renferme des quantités relativement faibles, 650 mg par kilogramme de champignons secs, soit environ 50 mg par kilogramme de champignons frais.

Il est délicat d'identifier un stérol par son analyse et ses constantes physiques. Les spectres de résonance magnétique nucléaire, de

masse et le spectre infra-rouge de ce stérol sont identiques à ceux donnés par un ergostérol de référence. Nous pouvons donc conclure à l'identité de ce stérol avec l'ergostérol ou 3 β hydroxy 24 méthyl cholest-5.7.22 triène.



Les points de fusion indiqués, dans la bibliographie, pour l'ergostérol varient de 140 à 165° selon la méthode utilisée et selon les auteurs. Nous avons trouvé des points de fusion variant de 140 à 150°.

Le pouvoir rotatoire en solution chloroformique variait, suivant les fractions obtenues lors des différentes extractions, entre — 115° et — 126°. Le pouvoir rotatoire donné pour l'ergostérol est de — 130° $\pm$ 5° (58).

Le spectre de masse indique un poids moléculaire de 396 qui correspond bien à l'ergostérol : C₂₈ H₄₄ O.

Spectre U.V.

Le spectre U.V. montre quatre maximum d'absorption dont le principal est à 283 m μ , les autres sont à 262, 271 et 294 m μ .

Cette absorption dans la région du spectre comprise entre 260 et 285 m μ est caractéristique des diènes homoannulaires et se trouve dans tous les spectres des stéroïdes possédant deux doubles liaisons conjuguées dans le même cycle.

Spectre I.R.

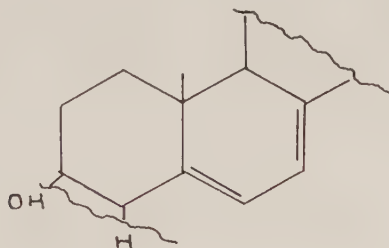
Le spectre I.R. montre à 3.400 cm⁻¹ la présence d'une bande OH dont on remarque les résonances entre 1.100 et 1.300 cm⁻¹. Deux bandes à 1.600 et 1.650 cm⁻¹ correspondent aux doubles liaisons C=C conjuguées.

Spectre de masse.

Le spectre de masse est caractérisé par un pic de base à m/e 396 correspondant au pic moléculaire, ce qui indique une structure relativement stable. Un autre pic important à m/e 363 résulte de

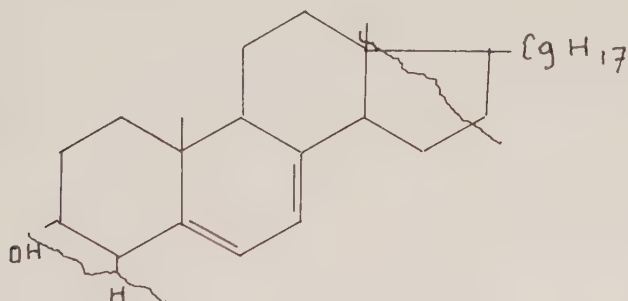
la perte d'un groupement méthyle et d'une fonction hydroxyle qui est éliminée par déshydratation ($M - 15 - 18$). Le pic à m/e 271 peut être attribué à l'ion formé par perte de la chaîne latérale $C_9 H_{17}$ ($M - 125$) et celui situé à m/e 253 correspond à $M - 125 - 18$.

A m/e 143 un pic correspond à la perte de la fonction hydroxyle et à la rupture du cycle C, rupture qui doit être due à la présence du système diénique qui stabilise le cycle B (35).



$M - 18 - 235$

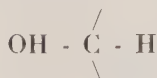
Le pic à m/e 211 est dû à la perte de la chaîne latérale en C_{17} avec trois autres groupements carbonés ainsi qu'à la déshydratation due au OH en position 3.



Spectre de R.M.N.

Il est caractérisé par la présence à δ 5,16 et 5,30 ppm de deux signaux dûs aux hydrogènes éthyléniques et qui correspondent à 4 hydrogènes sur la courbe d'intégration. Ce résultat est en accord avec la formule de l'ergostérol.

A δ 3,61 ppm un signal est dû à l'hydrogène en α de la fonction hydroxyle.



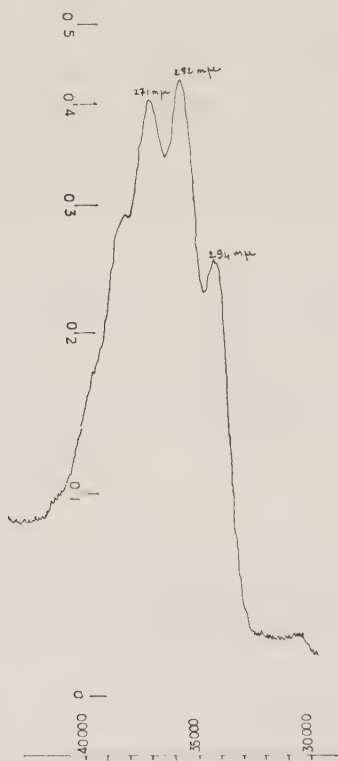
Quant aux singulets situés à δ 0,63 ; 0,8 ; 0,88 ; 0,95 ; 0,98 et 1,1 ppm, ils correspondent aux hydrogènes des groupements méthyles.

Dispersion rotatoire.

La dispersion rotatoire, c'est-à-dire la variation du pouvoir rotatoire en fonction de la longueur d'onde, a parfois servi pour l'étude de la structure des stérols. Pour un même stérol elle peut être positive ou négative suivant les isomères.

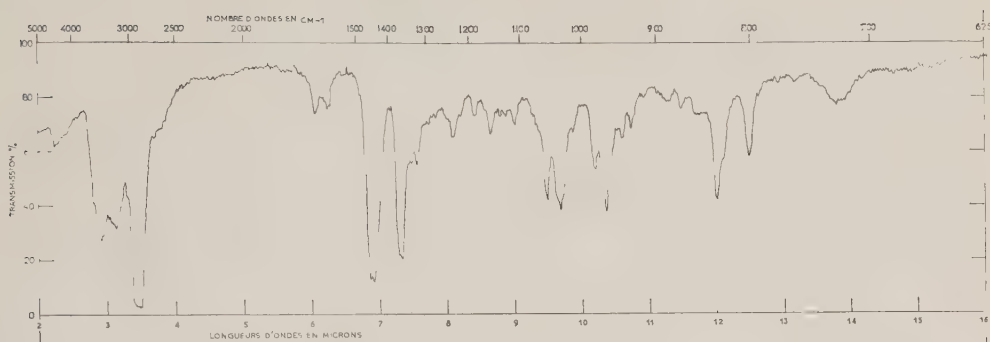
Nous avons fait la courbe de dispersion rotatoire simultanément pour l'ergostérol de référence et pour le stérol que nous avons isolé. Dans les deux cas la courbe est négative, ce qui distingue l'ergostérol de ses stéréoisomères qui donnent une courbe positive (64).

DONNEES SPECTRALES DE L'ERGOSTEROL

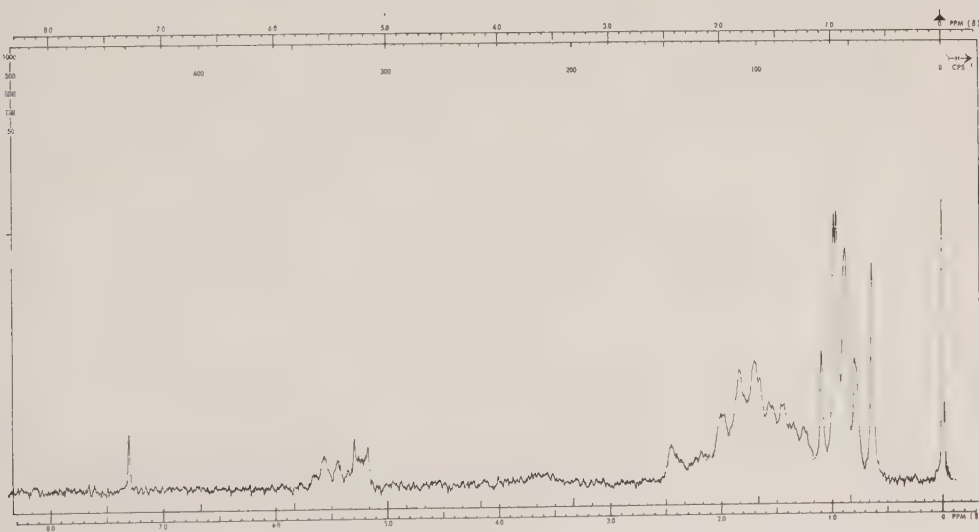


Spectre U.V.

DONNEES SPECTRALES DE L'ERGOSTEROL



Spectre I.R.



Spectre de R.M.N.

DONNEES SPECTRALES DE L'ERGOSTEROL



Spectre de masse

Etude de la fonction alcool : Dérivé acétylé.

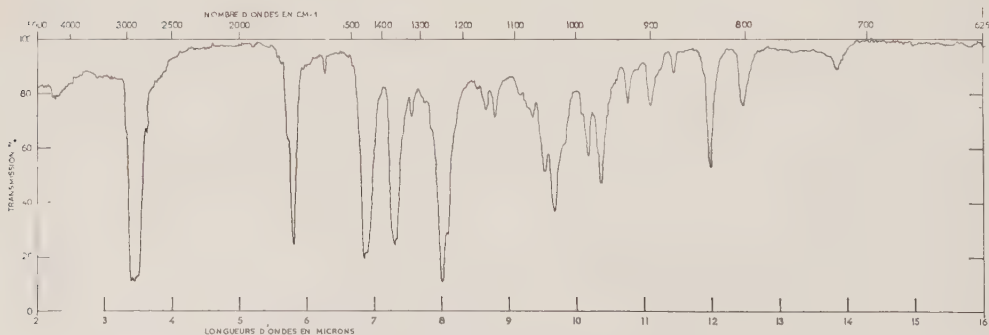
Pour obtenir le dérivé acétylé de l'ergostérol nous avons fait réagir à chaud l'anhydride acétique en présence de pyridine. Les diverses méthodes d'acétylation à froid par l'anhydride acétique et l'acétate de sodium ou la pyridine nous ont toujours donné des mélanges de dérivé acétylé et de stérol de départ.

L'acétate d'ergostérol fond sous microscope à $143 - 145^{\circ}$ et répond à la formule $C_{30}H_{46}O_2$.

Son pouvoir rotatoire est de $-69^{\circ} \pm 2^{\circ}$, alors que les valeurs données dans la bibliographie sont de $-92^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (58).

Spectre I.R.

Il est caractérisé par la disparition totale de la bande OH à 3.400 cm^{-1} et l'apparition à 1.725 et 1.240 cm^{-1} d'une bande ester très intense.



Spectre I.R. de l'ergostérol acétylé

III. — PARTIE EXPERIMENTALE.

Propriétés physiques.

Recristallisé du méthanol ou de l'éthanol, l'ergostérol se présente sous forme de paillettes blanches brillantes.

Il est soluble dans l'éther, l'éther de pétrole, le benzène, l'éthanol et le méthanol, assez soluble dans le chloroforme et l'acétone.

Point de fusion.

Cet ergostérol fond à 148 - 150° en tube capillaire et à 140 - 142° sous microscope. La fusion se fait sans décomposition, on constate seulement un léger jaunissement lorsqu'on le chauffe à une température voisine de 170°.

Analyse.

Il est très difficile de l'obtenir parfaitement anhydride. Avant l'analyse nous l'avons séché sous vide de 0,01 mm pendant 20 heures à 50°.

Analyse :	$C_{25} H_{44} O$		
Calculé % :	C 84,78	H 11,18	O 4,03
Trouvé :	84,05	11,01	4,77

L'analyse obtenue pour l'ergostérol de référence, séché dans les mêmes conditions, était identique.

Pouvoir rotatoire.

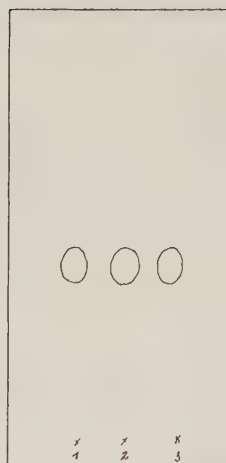
L'ergostérol est lévogyre, en solution dans le chloroforme :

$$[\alpha] D^{20} = - 115^{\circ} \text{ à } - 126^{\circ} \text{ (c = 0,010 g/cc)}$$

Sublimation.

L'ergostérol se sublime, sous vide de 0,01 mm, à 138°, sans se décomposer. En effet, par chromatographie sur plaque, le produit obtenu après sublimation donne une tache rigoureusement identique à celle donnée par l'ergostérol avant sublimation.

Le solvant utilisé est du chlorure de méthylène contenant 3 % de méthanol. La révélation des taches est faite par l'acide sulfurique 0,5 N et chauffage.



1. Stérol avant sublimation
2. Stérol sublimé
3. Ergostérol de référence

Réactions colorées.

Nous avons effectué sur le stérol les réactions colorées caractéristiques de l'ergostérol (54). Elles sont toutes positives et les colorations obtenues sont identiques à celles données par l'ergostérol de référence. Ces colorations confirment l'identité avec l'ergostérol d'un des stérols isolés du *Tricholome prétentieux*.

Réaction de Liebermann-Burchard.

L'ergostérol donne, avec le réactif de Liebermann-Burchard, une coloration rouge violacé virant rapidement au vert.

Réaction de Carr et Price.

Par addition à 0,5 ml d'une solution chloroformique d'ergostérol de 2 ml de solution chloroformique saturée de trichlorure d'antimoine nous obtenons une coloration rose virant au bleu vert.

Réaction de Salkowski.

Par addition d'acide sulfurique à une solution chloroformique d'ergostérol on obtient une coloration jaune de la couche chloroformique.

Coloration avec l'hydrate de chloral.

En présence d'hydrate de chloral liquéfié au bain-marie l'ergostérol donne une coloration bleu vert.

Coloration avec le chlorure de zinc.

10 mg d'ergostérol sont dissous dans 5 ml de chloroforme puis on ajoute 2 ml d'anhydride acétique et 2 g de chlorure de zinc. Celui-ci se colore en rose et une coloration vert émeraude se développe dans le liquide.

Dérivé acétylé.

- Préparation :

100 mg d'ergostérol sont dissous dans 1 ml de pyridine anhydre. On ajoute 3 ml d'anhydride acétique et on porte le mélange au bain-marie bouillant pendant deux heures. La solution est ensuite versée sur de la glace pilée. Il se forme un précipité qui est recueilli sur verre fritté et lavé à l'eau glacée jusqu'à élimination de la pyridine.

Nous obtenons ainsi 80 mg de dérivé acétylé se présentant sous l'aspect d'une résine. Après deux recristallisations de l'éthanol on obtient 68 mg d'acétate d'ergostérol pur.

- Propriétés physiques :

Ce dérivé acétylé se présente sous forme de petits cristaux blancs. Il fond sous microscope à 140 - 145°.

Il est soluble dans le chloroforme, l'éther, l'acétone, le méthanol et l'éthanol.

Il est lévogyre, en solution dans le chloroforme :

$$[\alpha] D^{20} = - 69^{\circ} \pm 2^{\circ} (c = 0,010 \text{ g/cc})$$

- Analyse :

Son analyse correspond au dérivé monoacétylé $C_{30} H_{46} O_2$.

Calculé % : C 82,13 H 10,57 O 7,29

Trouvé : 82,16 10,54 7,16

P O R T E N S T É R O L

I. — PARTIE THEORIQUE.

A) CRITERES D'IDENTIFICATION

Nous avons isolé du *Tricholome prétentieux*, à côté de l'ergostérol, un autre stérol qui n'avait jamais été isolé à l'état naturel et qui n'avait pas été obtenu par synthèse.

Nous proposons pour ce stérol le nom de portenstérol.

De formule moléculaire $C_{28}H_{44}O_2$, c'est un isomère monohydroxylé de l'ergostérol caractérisé par la présence de deux fonctions hydroxyles fixées sur le noyau. Ce fait est assez exceptionnel car tous les stérols naturels extraits du règne végétal ne possèdent qu'une fonction hydroxyle, à l'exception du cérévistérol qui en possède trois.

Ce stérol est le premier du groupe de l'ergostérol possédant deux hydroxyles retiré du règne végétal; aucun stérol dihydroxylé de ce type n'a, d'autre part, été synthétisé. Nous ne pouvions donc pas, pour l'étude de sa structure, nous référer à des données bibliographiques.

Les deux fonctions hydroxyles sont secondaires, acétylables et oxydables en fonctions cétones.

La molécule de portenstérol renferme également trois doubles liaisons dont une dans la chaîne latérale. Cette chaîne latérale est en C_9H_{17} , donc identique à celle de l'ergostérol. Les deux autres doubles liaisons, situées dans le squelette, ne sont pas conjuguées.

Les très faibles quantités de stérol que nous avons extraites ne nous ont pas permis de fixer leur position avec certitude. Nous envisagerons donc plusieurs possibilités pour l'emplacement de ces deux doubles liaisons.

Propriétés physiques

1. *Point de fusion.*

Les points de fusion sont des critères indispensables de pureté des composés organiques, mais ceux des stérols sont souvent peu nets.

Lorsqu'on observe la fusion au microscope en chauffant très lentement on constate que la fusion des premiers et des derniers cristaux se fait parfois sur un intervalle de 5 à 6°. Le point de fusion dépend aussi de la forme de cristallisation et, pour un même produit pur, il peut varier de 2 à 3° suivant la forme de cristallisation.

Le portenstérol cristallise en prismes irréguliers et, à 245° on observe au microscope un changement net de la forme de cristallisation. Les cristaux se transforment en très fines aiguilles qui fondent entre 248 et 250°.

Ce point de fusion est supérieur à celui de nombreux autres stérols qui fondent en général entre 100 et 200°. Cette augmentation est probablement due à la présence des deux fonctions hydroxyles. En effet, le cérévistérol qui renferme trois OH présente lui aussi un point de fusion élevé : 256°. Il est intéressant de signaler cette augmentation de la température de fusion parallèlement avec le nombre de fonctions hydroxyles. Si elle est confirmée par d'autres exemples elle pourra servir à l'étude de nouveaux stérols.

2. Solubilités.

Les deux fonctions hydroxyles fixées sur la molécule du portenstérol influent fortement sur sa solubilité dans les différents solvants. Il est faiblement soluble à froid dans les solvants hydroxylés, relativement soluble à chaud et très peu soluble dans les solvants hydrocarbonés.

Il est important de signaler que, contrairement aux autres stérols, le portenstérol est très peu soluble dans le chloroforme. Cette insolubilité a rendu impossible l'établissement des différents spectres à partir de solutions chloroformiques de ce corps. Il a toujours été nécessaire d'opérer avec des solutions chloroformiques renfermant du méthanol.

3. Pouvoir rotatoire.

Le pouvoir rotatoire est très employé comme critère d'identification des composés organiques. Nous savons qu'il varie en fonction du solvant, de la concentration et de la température. Cependant, pour les stéroïdes, les chiffres donnés dans la littérature par les différents auteurs ne sont pas toujours identiques.

Certaines données correspondent à des mélanges de stérols, ceux-ci étant le plus souvent difficiles à séparer et à obtenir très purs. De nombreux stérols isolés il y a un certain nombre d'années sont, en réalité, des mélanges, on ne peut donc pas tenir compte des constantes physiques signalées dans les références bibliographiques anciennes ou même parfois assez récentes.

Le pouvoir rotatoire permet de calculer le pouvoir rotatoire moléculaire qui donne de précieuses indications sur la structure et la configuration stéréochimique des stéroïdes, notamment par analogie avec d'autres composés de la même série dont la structure et la configuration ont été établies.

Le portenstérol est lévogyre comme les autres stérols extraits des Basidiomycètes.

$$[\alpha]_{\text{D}^{20}} = - 53^{\circ} \pm 1^{\circ}$$

Analyse

On sait que les stérols retiennent fortement les solvants de cristallisation, nous avons vu que l'ergostérol présente cette particularité. Le portenstérol retient encore plus fortement les molécules de solvant de cristallisation. Il cristallise avec une molécule d'eau et il ne nous a pas été possible de l'obtenir anhydre.

Nous pouvons cependant affirmer avec certitude son poids moléculaire qui a été déterminé par la spectrométrie de masse. Il est de 412 et correspond à la formule $C_{28}H_{44}O_2$.

Sublimation

Le portenstérol se sublime facilement comme de nombreux stérols. Le produit obtenu après sublimation est identique au produit de départ comme le prouvent son point de fusion et les résultats des chromatographies sur plaques qui ont été effectuées.

Le portenstérol paraît donc être un composé stable.

Réactions colorées

Les stérols, comme les triterpènes, donnent des colorations caractéristiques avec le réactif de Liebermann-Burchard et avec le réactif de Noller (67).

Il est indispensable d'effectuer les réactions colorées sur le stérol parfaitement pur, des traces d'autres stérols extraits simultanément pouvant donner des colorations qui interfèrent.

a) Réaction de Liebermann-Burchard.

Avec le réactif de Liebermann-Burchard le portenstérol donne une coloration rouge violacé très intense qui vire au violet et reste très stable. On admet généralement que le virage du rouge au vert de la coloration, c'est le cas pour l'ergostérol, est spécifique des stérols. La coloration violette qui ne vire pas au vert donnée par le portenstérol montre que l'absence de virage au vert ne permet pas de rejeter l'hypothèse d'un stérol.

Par contre cette réaction, effectuée avec du chlorure de zinc au lieu de l'acide sulfurique, donne, comme dans le cas de l'ergostérol, une coloration rose qui vire au vert.

b) Réaction de Noller.

Cette réaction avait été décrite pour les triterpènes, qui donnent une coloration bleue, mais elle n'est pas spécifique.

Le portenstérol donne une réaction de Noller rouge orangé très intense et très stable alors que la coloration obtenue avec l'ergostérol est rouge vif.

c) *Réaction de Salkowski.*

Le portenstérol en solution chloroformique donne, avec l'acide sulfurique concentré, une coloration fuschine très intense et très stable.

Cette réaction permet de le différencier nettement de l'ergostérol qui donne une coloration safran. Le cholestérol donne une coloration variant du jaune au rouge suivant la concentration.

d) *Réaction de Rosenheim.*

La coloration rouge virant au vert donnée par le portenstérol en présence d'hydrate de chloral liquéfié serait spécifique des stérols du groupe de l'ergostérol.

e) *Réaction de Carr et Price.*

Le portenstérol, comme l'ergostérol, donne une réaction positive. En présence de trichlorure d'antimoine et en solution chloroformique il se développe une coloration rouge qui vire au mauve.

f) *Test de Tortelli-Jaffé.*

Ce test effectué sur le portenstérol est négatif alors que l'ergostérol donne une coloration verte en solution acétique par addition d'une solution chloroformique de brome.

g) *Fluorescence aux U.V.*

Examinée en lumière de Wood une solution chloroformique de portenstérol présente une fluorescence bleue.

Les colorations données par le portenstérol, en particulier avec le réactif de Liebermann-Burchard et avec le réactif de Noller, ne permettent pas d'affirmer s'il appartient au groupe des triterpènes ou à celui des stérols. Son analyse et surtout les spectres de masse et de résonance magnétique nucléaire nous ont permis d'établir sa nature stérolique.

B) DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES STEROLS

La chimie des stéroïdes n'a été bien étudiée que depuis une quarantaine d'années et, en raison de l'action physiologique importante d'un grand nombre de ces composés, les recherches sur ce sujet ont pris un développement considérable.

Si l'étude des stéroïdes à activité hormonale et celle des saponines cardiotoniques a été très poussée, il n'y a eu, comme nous l'avons vu, que très peu de stérols isolés des cryptogames. Ces recherches ne sont pas récentes et, dans l'étude de la structure du nouveau stérol que nous avons obtenu, nous n'avons pas pu effectuer de comparaison avec d'autres spectres publiés dans la bibliographie.

Les faibles quantités de portenstérol que nous avons pu isoler ne nous permettaient pas d'effectuer les nombreuses réactions chimiques classiques nécessaires à la détermination de la structure. C'est pourquoi nous avons dû l'étudier principalement en nous référant aux résultats qui nous ont été fournis par les procédés physiques. Nous avons utilisé en particulier la spectrophotométrie ultra-violet et infra-rouge, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire. Ces procédés ne nécessitent en effet que des quantités peu importantes de produit pur.

Les résultats de ces études physiques se complètent et elles doivent être effectuées simultanément. Le spectre ultra-violet donne des renseignements sur la position des doubles liaisons alors que le spectre infra-rouge met en évidence les groupements fonctionnels. Le spectre de masse et celui de résonance magnétique nucléaire donnent des résultats plus précis sur la structure de la molécule mais leur interprétation est plus délicate. En effet, ils n'ont été appliqués à la chimie organique que depuis cinq à six ans et il est parfois difficile de les expliquer totalement.

Nous rappellerons le principe de ces techniques et la contribution qu'elles apportent à l'étude des stéroïdes.

Spectre ultra-violet (75).

Le spectre ultra-violet est dû à l'absorption, par les électrons π des doubles liaisons, de l'énergie qui leur est nécessaire pour passer d'un état stable à un état excité. Cette énergie leur est fournie par le flux lumineux.

Les électrons des doubles liaisons isolées $>C = C<$ sont plus stables et leur déplacement nécessitera une énergie W importante. Comme cette énergie varie en fonction de la longueur d'onde :

$$W = h \nu = h \times \frac{1}{\lambda}.$$

l'absorption se fera à une longueur d'onde de l'ordre de 180 μ inaccessible aux spectrophotomètres utilisés.

Mais si les doubles liaisons forment des systèmes conjugués, les électrons π seront plus instables et l'énergie nécessaire à leur déplacement sera moins importante. Ils absorberont donc à une longueur d'onde supérieure se rapprochant du visible.

Ces groupements qui absorbent l'énergie sont appelés groupes chromophores.

ABSORPTION ULTRA-VIOLETTE DES GROUPEMENTS CONJUGUES CONTINUS DANS LES STEROIDES (49)

Type	λ Max.	$10^{-3} \cdot \epsilon$ max.
Diènes		
2, 4-diène O	275	6-20
3, 5-diène E	235	17-20
4, 6-diène E	239	20-28
5, 7-diène O	271, 282	10-15
6, 8 (9)-diène O	275	5
7, 9 (11)-diène E	243	11-17
7, 14-diène E	242	10-15
8 (9), 14-diène E	248	16-20
Triènes		
3, 5, 7-triène	315	16-23
5, 7, 9 (11)-triène	324	10-15
Cétones insaturées		
1-ène-3-one	230	10-13
4-ène-3-one	241	10-23
5-ène-7-one	239	9-15
8(9)-ène-7-one	253	8-13
8(9)-ène-11-one	254	8-10
9(11)-ène-12-one	240	8-16
16-ène-20-one	240	8-16
8(9)-ène-7, 11-dione	270	6- 9
1, 4-diène-3-one	244	10-19
3, 5-diène-7-one	279	25-28
4, 6-diène-3-one	284	25-30
Lactones		
Buténolide	217	10-20
Pentadiénolide	300	4- 7
Structures aromatiques		
Cycle A aromatique	280	
(₃ OH)	280	2- 2, 5
Cycles A et B aromatiques		
(₃ OH)	230	40
Benzoyloxy	243	12-13
(benzoate d'un alcool)	280	1

O = dans un même cycle.

E = dans des cycles différents.

Seuls les stérols renfermant un système de doubles liaisons conjuguées montrent une absorption caractéristique due à ces doubles liaisons et à leur place dans les différents cycles.

Les maximum d'absorption dépendent des substituants portés par les groupements. Ils peuvent être calculés, lorsqu'on connaît la formule du stéroïde, en utilisant les règles données par WOODWARD. Celles-ci, en partant d'un maximum de base différent si on a un diène homo ou hétéroannulaire, font intervenir les substituants fixés sur les carbones formant le système conjugué et, éventuellement, les autres doubles liaisons conjuguées (29), (30).

Ainsi, lorsqu'un stéroïde présente un maximum d'absorption dans l'ultra-violet, une simple étude de son spectre donne d'importantes indications sur la place des doubles liaisons qu'il renferme.

Spectre infra-rouge (4), (23).

Le spectre infra-rouge résulte de l'absorption d'énergie par les électrons qui existent dans les liaisons des groupements fonctionnels. Cette absorption a lieu dans la région du spectre comprise entre 4.000 et 1.200 cm^{-1} , fréquence nécessaire au déplacement des électrons.

Absorption	Vibration des liaisons
3.200-3.500 cm^{-1}	O—H, N—H
2.000-2.300 cm^{-1}	C—N, C—C, N—N
1.600-1.750 cm^{-1}	C=C, C=O, C=N
1.000-1.200 cm^{-1}	C—O, C—N

Dans l'étude des stéroïdes le spectre d'absorption dans l'infra-rouge permet de révéler ou de confirmer l'existence des groupements fonctionnels ou de suivre leur transformation au cours des réactions chimiques.

Spectre de masse (11), (18).

La molécule, à l'état de vapeur, est soumise, dans le vide et à une température convenable, à un flux électronique. Elle perd alors généralement un électron en donnant un ion M^+ . Souvent aussi le squelette de la molécule subit des fragmentations qui conduisent à des ions chargés positivement.

Ces ions sont différenciés par un effet électromagnétique et on mesure pour chacun le rapport m/e qui le caractérise.

Le spectre de masse permet de déterminer avec précision le poids moléculaire : cette possibilité est particulièrement précieuse dans les cas où les méthodes classiques sont inutilisables.

En chimie organique on s'est attaché à relier les fragmentations observées à la structure.

Certains hétéroatomes, tels que N, O, dirigent de façon préférentielle les coupures ainsi que des groupements, comme le groupement dioxolanne, et les doubles liaisons. Celles-ci induisent, en effet, toujours une coupure en position β .



Le spectre de masse des stérols présente peu de coupures caractéristiques. C'est la présence des doubles liaisons qui joue un rôle prépondérant dans la fragmentation. Ainsi la présence de deux doubles liaisons conjuguées dans le cycle B de l'ergostérol stabilise ce cycle et induit des coupures dans le cycle C.

On observe souvent la perte de certains groupements fonctionnels, telle la perte de la fonction OH chez les stéroïdes hydroxylés.

Spectre de résonance magnétique nucléaire (6).

La résonance magnétique nucléaire est le témoin de la propriété qu'ont les protons H^+ d'absorber de l'énergie lorsqu'ils sont placés dans des champs magnétiques intenses. Elle se traduit sur le spectre par une succession de signaux.

La position d'un signal indique le déplacement chimique δ et elle rend compte de l'environnement d'un proton donné. Par exemple, les groupements méthyles $\geq C-CH_3$ donnent des signaux entre 0.5 et 1.5 ppm : les protons des groupements $CH_3-N<$ entre 2 et 4 ppm : les protons éthyléniques de 5 à 6 ppm : ceux des fonctions hydroxyles de 4 à 5 ppm.

La nature du signal renseigne sur le nombre de protons situés en α du proton considéré.

De plus le spectre de résonance magnétique nucléaire permet, par l'intégration de la courbe, une mesure quantitative du nombre de protons mis en jeu dans une région donnée de la molécule.

C) DISCUSSION DE LA STRUCTURE DU PORTENSTEROL

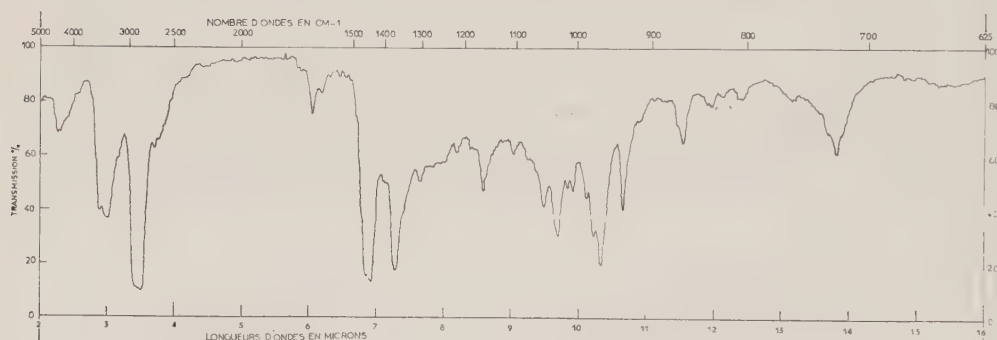
Le portensterol cristallise de l'éthanol en petits cristaux blancs, F : 250°, $[\alpha]_D$: — 53°. L'analyse indique qu'il cristallise avec une molécule d'eau : $C_{28}H_{44}O_2 \cdot H_2O$. Poids moléculaire 430 (412 + 18).

Ce produit est transparent aux U.V. à une longueur d'onde su-

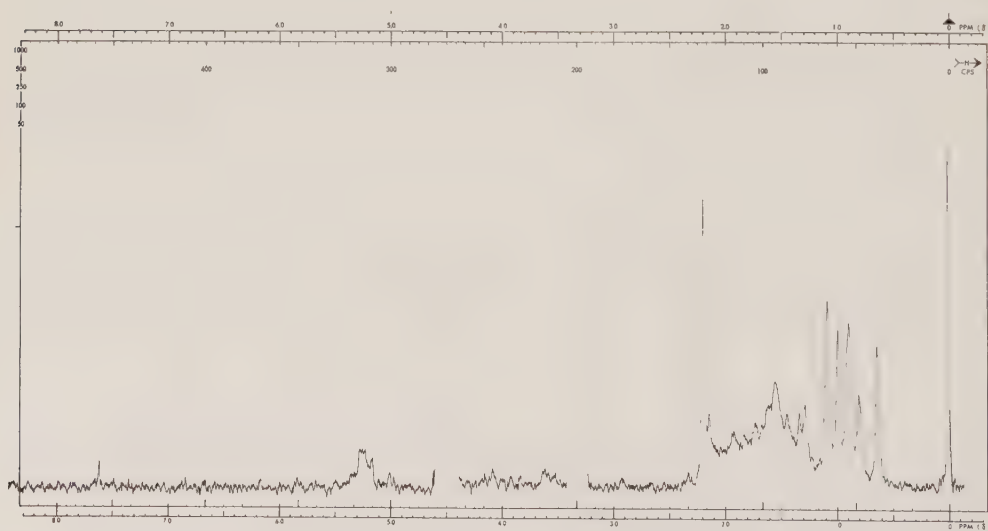
périeure à 200 m μ . On observe cependant une faible absorption, avec ϵ inférieur à 1.000 à 248 m μ . Il est très probable que cette faible absorption soit due à un transfert de charges entre deux doubles liaisons homocycliques non conjuguées. La présence d'un tel système peut vraisemblablement expliquer la fluorescence bleue des solutions chloroformique de portenstérol.

Le spectre I.R. est caractérisé par une bande d'absorption intense à 3.200-3.300 cm $^{-1}$ qui peut être attribuée à une ou plusieurs fonctions alcool.

DONNEES SPECTRALES DU PORTENSTEROL

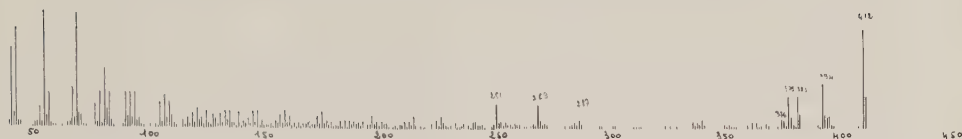


Spectre I.R.



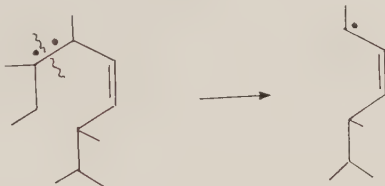
Spectre de R.M.N.

DONNEES SPECTRALES DU PORTENSTEROL



Spectre de masse

Le spectre de masse confirme la valeur du poids moléculaire par un pic M^+ à m/e 412. La présence de deux pics à $412 - 18$ et $412 - (18 + 18)$ peut s'expliquer par la présence dans la molécule de deux fonctions alcool secondaires. On observe, d'autre part, un ion à m/e 287 qui, dans le spectre de masse de l'ergostérol, correspond à l'ion m/e 271 attribué à la coupure de la chaîne latérale.



A l'ion m/e 287 correspondent deux autres ions respectivement m/e $287 - 18 = 269$ et m/e $287 - 18 - 18 = 251$. Ces ions indiquent que les deux fonctions alcool ne sont pas portées par la chaîne mais par le squelette qui, dans notre hypothèse, est vraisemblablement stéroïdique.

On peut donc affirmer l'hypothèse d'une structure de type stéroïdique qui est confirmée par les réactions colorées que présente le portenstérol. Ce nouveau stérol possède une chaîne latérale identique à celle de l'ergostérol avec une double liaison 22, 23, deux fonctions alcool secondaires et deux doubles liaisons portées par le squelette stéroïdique.

Le spectre de R.M.N., très difficile à réaliser en raison de l'insolubilité du produit, a permis cependant de confirmer la nature stéroïdique du squelette. En effet, les signaux observés entre 0,65 et 1,15 ppm, qui correspondent aux différents groupes méthyles, sont très voisins de ceux observés dans le spectre de l'ergostérol.

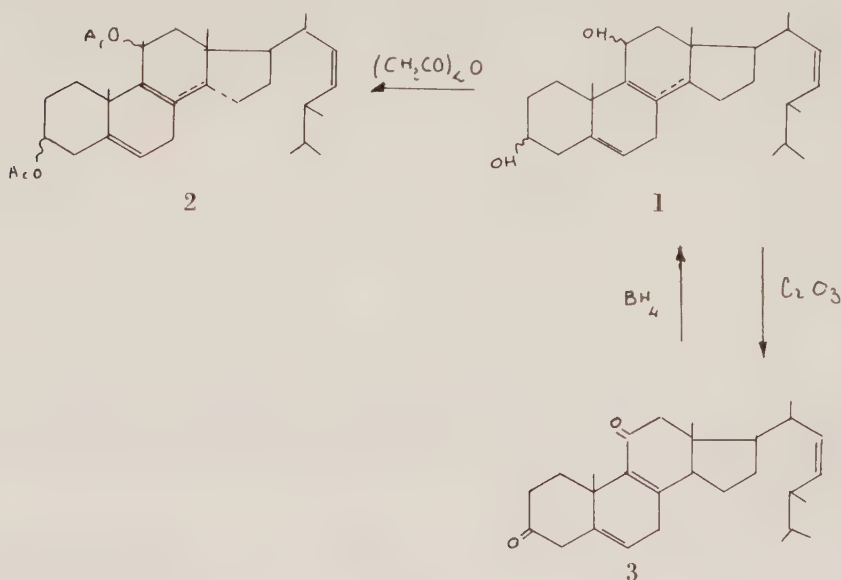
D'autre part, ce spectre permet de préciser la nature des trois doubles liaisons, les signaux des protons éthyléniques apparaissent sous forme d'un multiplet à 5,25 ppm et correspondent à trois protons. La place de ce signal est identique à celle observée dans le spectre de R.M.N. de l'ergostérol pour les deux protons de la chaîne latérale. On peut donc admettre que le signal du portenstérol correspon-

gant à trois protons inclue les deux protons de la chaîne latérale et un proton oléfinique correspondant à une double liaison dans le squelette.

Ceci démontre que, des deux doubles liaisons portées par le squelette, l'une est trisubstituée et l'autre tétrasubstituée.

Le portenstérol apparaît donc comme un hydroxyisocergostérol 1. En effet, dans l'ergostérol, les deux doubles liaisons conjuguées du squelette sont caractérisées dans le spectre de R.M.N. de celui-ci par un signal multiple correspondant à deux protons à 5,50 ppm, les deux doubles liaisons de l'ergostérol étant trisubstituées.

Cette hypothèse est confirmée chimiquement.



Dérivé acétylé.

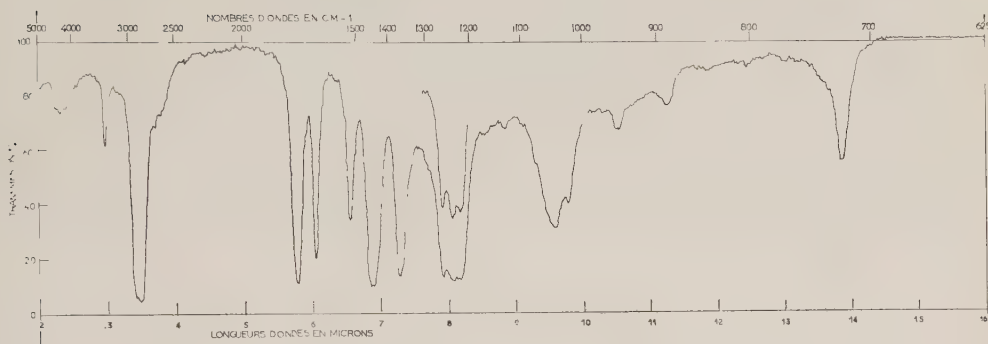
L'acétylation a été faite à chaud par l'anhydride acétique en présence de pyridine. L'acétylation à froid par l'anhydride acétique et la pyridine ou l'acétate de sodium nous a toujours conduits à des mélanges de dérivés monoacétylé, diacétylé 2 et de portenstérol. Il ne nous a pas été possible d'isoler le dérivé monoacétylé qui se forme seulement en faibles quantités.

Le dérivé diacétylé présente un double point de fusion : 59° et 160° . $[\alpha]_D = -119^\circ$.

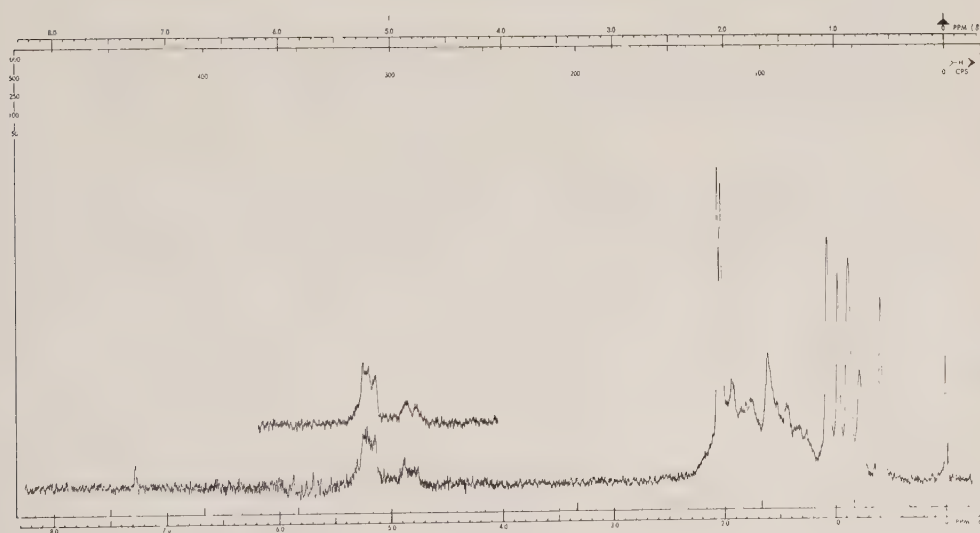
L'analyse montre qu'il cristallise avec une molécule d'eau, il possède la formule brute $C_{32}H_{48}O_4 \cdot H_2O$.

Son spectre U.V. présente les mêmes caractéristiques que celui du stérol de départ.

DONNEES SPECTRALES DU PORTENSTEROL ACETYLE



Spectre I.R.



Spectre de R.M.N.

Le spectre I.R. montre l'absence des bandes d'absorption attribuées aux fonctions hydroxyles et l'apparition d'une bande d'absorption à 1.740 cm^{-1} correspondant au groupement $\text{C}=\text{O}$.

De même, le spectre de R.M.N. est caractérisé par les signaux de deux $-\text{CH}_3$ à 2,03 et 2,06 ppm attribuables aux deux méthyles des deux groupements $\text{CH}_3-\text{COO}-$. On peut observer aussi dans le spectre de R.M.N. un signal, sous forme d'un multiplet à 4,83 ppm correspondant aux deux protons en α des fonctions acétoxy. Dans le spectre du portenstérol ces deux protons n'étaient pas visibles, car, étant déplacés vers les champs forts, ils étaient dissimulés par les signaux du solvant.

Ainsi l'obtention de ce dérivé diacétylé confirme la présence de deux fonctions alcool secondaires dans le portenstérol.

Portenstérone.

L'oxydation chromique du portenstérol par le réactif de Jones conduit à une dicétone, la portenstérone 3.

Celle-ci fond à 263° , c'est un composé dextrogyre :

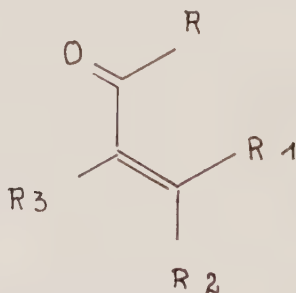
$$[\alpha] \text{ D} = + 38^\circ$$

Elle cristallise aussi de l'éthanol avec une molécule d'eau et son analyse conduit à la formule $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_2$, H_2O . Cette formule est confirmée par la présence, dans le spectre de masse, d'un pic M^+ à m/e 408.

Le spectre I.R. de cette cétone présente deux bandes dues à l'absorption du groupement $\text{C}=\text{O}$ à 1.710 et 1.670 cm^{-1} . Celles-ci sont attribuables respectivement à une cyclohexénone et à une cyclohexanone.

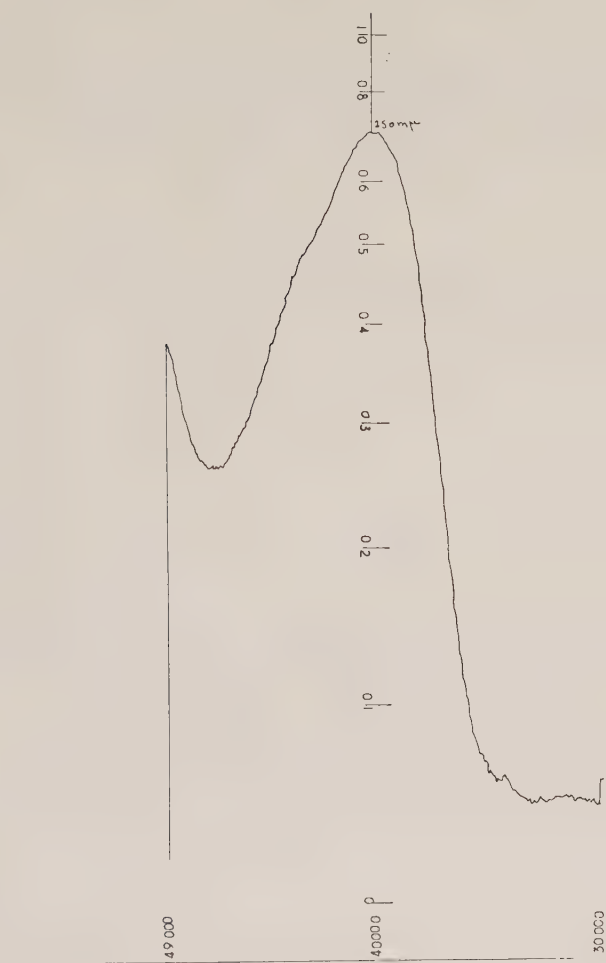
La présence d'une cétone conjuguée est confirmée par une bande d'absorption dans l'U.V. à λ 250 $m\mu$ (ϵ 11730).

La longueur d'onde observée indique vraisemblablement que la cétone est du type (77).

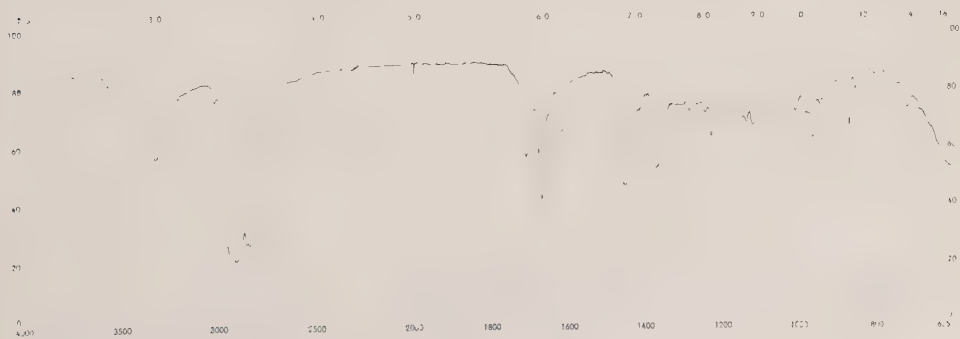


c'est-à-dire conjuguée avec une double liaison tétrasubstituée.

DONNEES SPECTRALES DE LA PORTENSTERONE

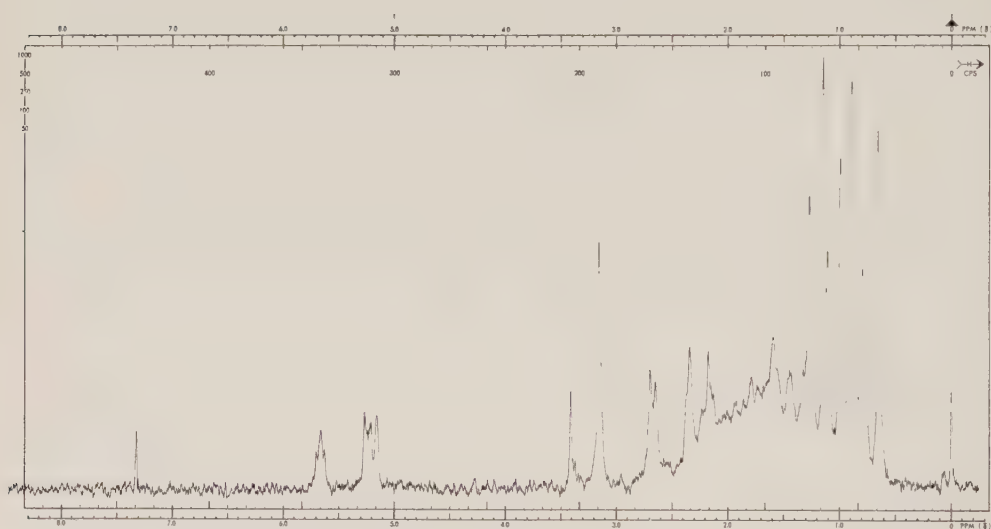


Spectre U.V.

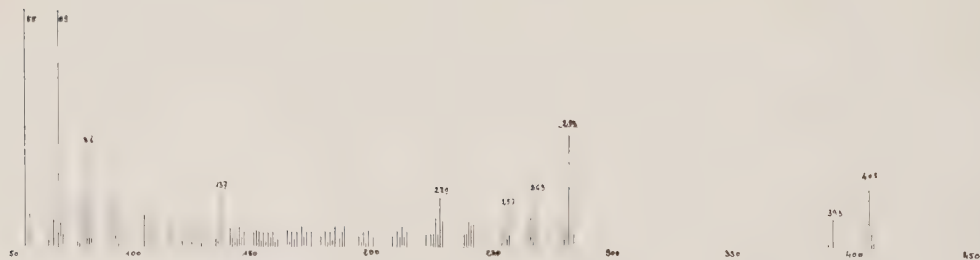


Spectre I.R.

DONNEES SPECTRALES DE LA PORTENSTERONE

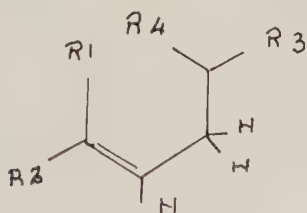


Spectre de R.M.N.



Spectre de masse

Le spectre de R.M.N. de cette cétone est caractérisé par la position et la nature du signal du proton oléfinique du squelette. Celui-ci apparaît en effet sous forme d'un triplet à 5,61 — 5,70 ppm, c'est-à-dire que le proton oléfinique est en α d'un CH_2 .



En étudiant l'ensemble de ces résultats il est possible de faire les déductions suivantes :

Si on pose l'hypothèse d'un squelette stéroïdique normal, la double liaison tétrasubstituée ne peut occuper que les positions 8,9 ou 8,14. La double liaison trisubstituée, non conjuguée à la précédente, ne peut alors occuper que les positions 4,5 ; 5,6 ou 16,17.

Envisageons successivement ces différentes positions. Pour fixer l'emplacement de l'autre double liaison et du second hydroxyle il était nécessaire d'étudier la structure de la portenstérone.

Double liaison en 16,17.

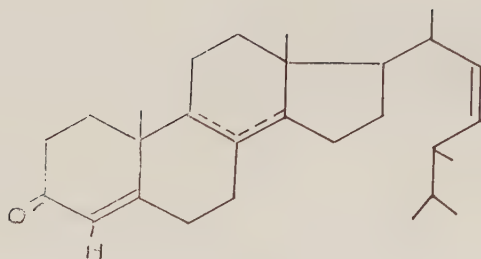
Cette position est facilement exclue car elle devrait interdire, ou tout au moins défavoriser, la perte de la chaîne latérale dans le spectre de masse. Ceci ne semble pas être le cas puisqu'on observe des pics à m/e 287 et m/e 251.

Double liaison en 4,5.

Si on envisage la position de la double liaison trisubstituée en 4,5, plusieurs cas peuvent se présenter suivant la position d'une fonction hydroxyle.

1. OH en 3.

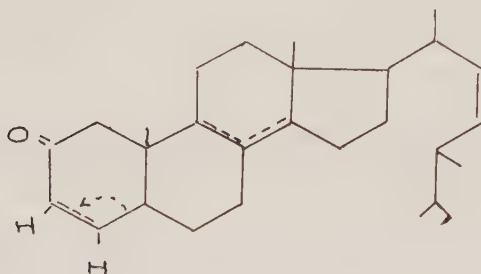
Chez la plupart des stérols hydroxylés il existe un hydroxyle en position 3. Si l'on admet que ce stérol possède, comme tous les stérols extraits des champignons, une fonction hydroxyle en position 3, la présence d'une double liaison en position 4,5 est exclue.



A

En effet, le proton en 4 devrait apparaître, dans le spectre de R.M.N. de la portenstérone, non comme un triplet, mais sous forme d'un singlet dont la position, à 5,70 ppm. est connue dans les cétones conjuguées de ce type.

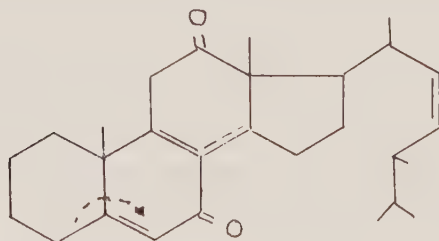
2. OH en 2.



B

Dans ce cas l'oxydation chromique du stérol conduirait à une cétone conjuguée par migration de la double liaison 4,5 en 3,4. Le spectre de R.M.N. d'une telle cétone présenterait deux protons oléfiniques au lieu d'un.

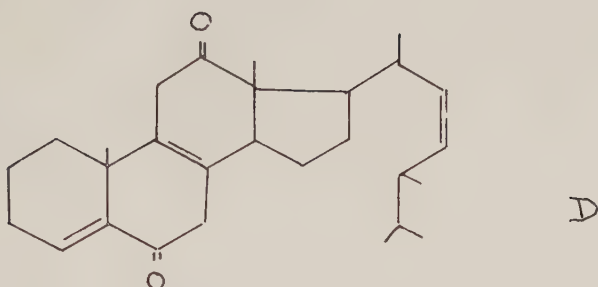
3. OH en 7.



C

La position en 7 d'un OH est exclue car la double liaison 4,5 devrait normalement se conjuguer en 5,6 au cours de l'oxydation chromique. On aurait ainsi une diènone qui présenterait une absorption dans l'U.V. de l'ordre de 300 mμ.

4. *OH en 6.*

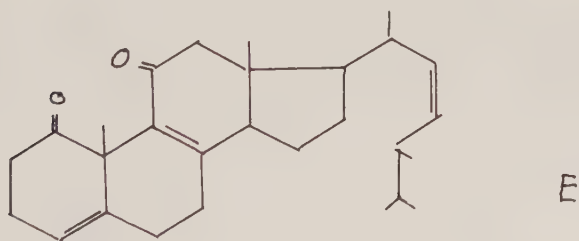


Cette position en 6 d'une fonction hydroxyle implique la position en 8,9 de la double liaison tétrasubstituée et la position en 12 de la seconde fonction hydroxyle.

Certaines fragmentations de spectrographie de masse de la dicétone pourrait être en faveur d'un hydroxyle en position 12 (m/e 257, m/e 229).

Par contre, une telle cétone conjuguée, Δ^4 one 6, devrait présenter une absorption dans l'U.V. à 244 m μ (ϵ 6300) alors que la bande d'absorption de la dicétone obtenue est à 250 m μ (ϵ 11730).

5. *OH en 1.*

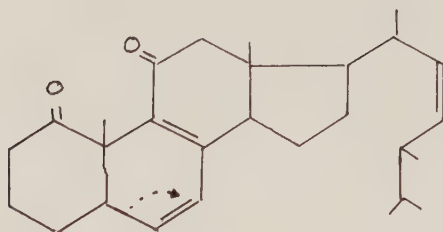


Les spectres de R.M.N. et de masse et le spectre U.V. sont en accord avec la possibilité d'un OH en 1 et d'une double liaison trisubstituée en 4,5.

Double liaison en 5,6.

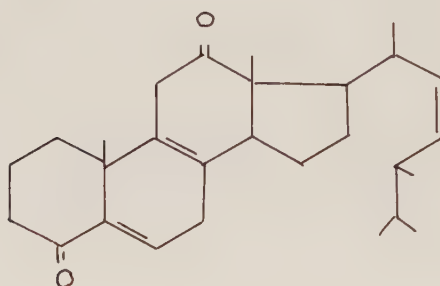
Comme dans le cas précédent, on peut envisager plusieurs positions possibles d'un OH.

1. *OH en 1 ou en 2.*



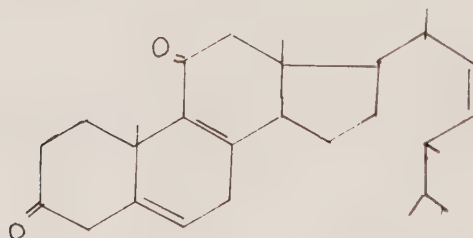
Ces positions sont exclues car l'oxydation devrait conduire à une diènone par migration de la double liaison de 5,6 en 6,7.

2. *OH en 4.*



Comme précédemment D, certaines fragmentations du spectre de masse pourraient être en faveur de la position en 12 d'une fonction hydroxyle. Mais, dans une telle cétone, la bande d'absorption dans l'U.V. devrait se situer à 244 mμ au lieu de 250 mμ.

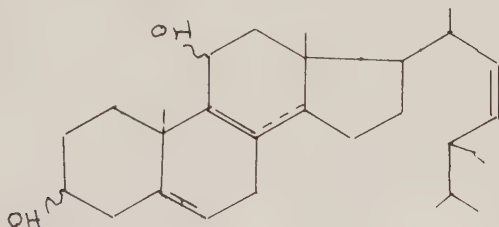
3. *OH en 3.*



Les résultats de l'étude des spectres sont en accord avec ces positions des doubles liaisons et des fonctions hydroxyles.

Etant donné la présence constante d'un des hydroxyles en position 3 dans la plupart des stérols et dans tous ceux extraits des champignons, on peut émettre l'hypothèse que la molécule de portenstérol renferme aussi un OH en 3. Dans ce cas, seule l'hypothèse H semble convenir.

Il faut cependant remarquer qu'une telle structure diénique homoannulaire non conjuguée est inusitée.



La réduction de la dicétone redonne en majorité le stérol de départ, ce qui est en faveur de positions identiques pour les doubles liaisons dans le portenstérol et dans la portenstérone, et, en particulier de la position 8,9 de la double liaison tétrasubstituée.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Propriétés physiques

Le portenstérol se présente sous forme de petits prismes irréguliers blancs. Il est soluble dans le méthanol et l'éthanol ; légèrement soluble dans le chloroforme, l'acétone, le benzène ; peu soluble dans l'éther, insoluble dans l'éther de pétrole et l'eau.

Il cristallise lentement de l'éthanol à 95°. Pour l'obtenir pur il est nécessaire de laisser la cristallisation s'amorcer à la température du laboratoire. On la complète par un séjour d'une quinzaine de jours au réfrigérateur. Il cristallise avec une molécule d'eau et il ne nous a pas été possible de l'obtenir anhydre même après un séchage prolongé sous un vide de 0,01 mm.

Il fond sous microscope à 248-250° et en tube capillaire à 255°.

La moindre trace d'impureté abaisse considérablement son point de fusion, certains échantillons qui paraissaient purs en chromatographie sur plaque fondaient à 130°. On achève aisément de le purifier

par une chromatographie dans l'éthanol sur trente fois son poids d'alumine neutre. L'élution à l'éthanol fournit le stérol pur.

Le portenstérol est lévogyre, en solution dans un mélange à parties égales de chloroforme et de méthanol.

$$[\alpha] D^{20} = - 53^{\circ} \pm 1^{\circ} (c = 0,010 \text{ g/cc})$$

Analyse

Comme pour la plupart des stérols il n'est pas possible d'obtenir pour le portenstérol une très bonne analyse.

Analyse :	$C_{28} H_{44} O_2, H_2 O$		
Calculé % :	C 78,09	H 10,77	O 11,15
Trouvé :	77,42	10,61	12,22

Réactions colorées

a) Réaction de Liebermann-Burchard.

A une solution de 5 mg de portenstérol dans 1 ml de chloroforme on ajoute 0,5 ml d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Il apparaît immédiatement une coloration rouge violacé qui vire au violet et qui est très stable.

b) Si on remplace, dans la réaction de Liebermann-Burchard, l'acide sulfurique par quelques centigrammes de chlorure de zinc, il apparaît une coloration rose qui vire assez rapidement au vert.

c) Réaction de Carr et Price.

L'addition de 2 ml de solution chloroformique saturée de trichlorure d'antimoine à 0,5 ml d'une solution chloroformique de portenstérol provoque une coloration rouge qui vire au mauve.

d) Réaction de Rosenheim.

2 mg de portenstérol mis en présence de 0,5 g d'hydrate de chloral liquéfié au bain-marie produisent une coloration rose très fugace qui vire au bleu vert.

e) Réaction de Salkowski.

Lorsqu'on ajoute quelques gouttes d'acide sulfurique concentré à une solution chloroformique de portenstérol il se développe immédiatement une coloration fuschine très intense.

f) *Réaction de Noller.*

Par addition de 2 mg de portenstérol à une solution à 0,01 % de trichlorure d'antimoine dans du chlorure de thionyle, il apparaît immédiatement une coloration rouge orangé qui est très stable.

g) *Test de Tortelli-Jaffé.*

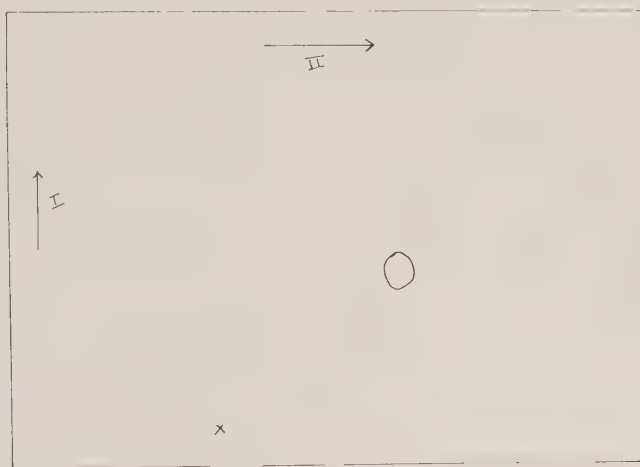
L'addition d'une solution de portenstérol dans l'acide acétique à une solution chloroformique de brome donne une coloration jaune.

Sublimation

Le portenstérol se sublime à 225° sous un vide de 0,01 mm. Le produit sublimé est blanc et cristallisé. Il fond sous microscope à 250° comme le produit de départ. Nous l'avons étudié en chromatographie sur plaque pour confirmer que sa structure n'avait pas été modifiée par sublimation.

En utilisant comme solvant de migration du chlorure de méthylène contenant 10 % de méthanol, nous obtenons une tache bleue après révélation par l'acide sulfurique 0,5 N et chauffage. Avant sublimation le portenstérol donnait dans les mêmes conditions une tache rigoureusement identique avec un Rf de 0,61.

Afin de confirmer cette stabilité nous avons aussi effectué la chromatographie bidimensionnelle d'un mélange à parties égales de portenstérol et de produit sublimé, dans les mêmes conditions que précédemment. Nous n'avons obtenu qu'une seule tache très nette.



I : Première migration
II : Seconde migration

Données spectrales du portenstérol

Spectre I.R. - Il présente une bande OH intense à 3.400 cm^{-1} et des bandes d'absorption à 1.650, 1.165, 1.030, 975, 940 et 870 cm^{-1} .

Spectre de masse. - Pic M+ à m/e 412, pics à m/e 394 (M—18), 379 (M—18—15), 376 (M—18—18), 287 (M—125), 269 (M—125—18), 251 (M—125—18—18).

Spectre de R.M.N. - Il présente un multiplet centré à 5,25 ppm correspondant à 3 protons éthyléniques et des signaux dûs aux hydrogènes des groupements méthyles à 0.65 : 0.81 : 0.90 : 1 et 1. 1 ppm.

FONCTION ALCOOL

1. *Dérivé acétylé.*

Préparation

40 mg de portenstérol sont dissous dans 1 ml de pyridine. On ajoute 2 ml d'anhydride acétique et le mélange est maintenu deux heures au bain-marie bouillant. La solution est ensuite refroidie et on ajoute de la glace pilée pour précipiter le dérivé acétylé. Ce dernier est filtré sur verre fritté et lavé à l'eau glacée jusqu'à élimination totale de la pyridine.

Nous obtenons ainsi 36 mg de dérivé acétylé brut qui, après cristallisation de l'éthanol à 95° , puis du méthanol, donne 32 mg de cristaux blancs en petits prismes irréguliers.

Propriétés physiques

Sous microscope, ce dérivé présente une première fusion à 59° puis il recrystallise immédiatement en très fines aiguilles qui fondent nettement à 160° . En raison de la rapidité de cette transformation il n'est pas possible de l'apercevoir lorsque le point de fusion est fait en tube capillaire.

Le portenstérol acétylé est soluble dans l'éther, le chloroforme, l'acétone, l'éthanol et le méthanol. Peu soluble dans les solvants hydrocarbonés.

Il est lévogyre, en solution chloroformique :

$$[\alpha] D^{20} = -119^{\circ} (c = 0,010\text{ g/cc})$$

Analyse

Comme le portenstérol, son dérivé acétylé cristallise avec une molécule d'eau qu'on ne peut éliminer sans altérer le produit.

Analyse :	$C_{32} H_{48} O_4, H_2 O$		
Calculé % :	C 74,67	H 9,79	O 15,54
Trouvé :	74,19	9,57	16,24

Chromatographie sur plaque

En chromatographie sur plaque ce dérivé acétylé donne une tache très nette, sans aucune trainée, nettement différente de celle du portenstérol. Son Rf. : 0,88 est supérieur à celui du portenstérol : 0,66.

Il s'agit donc bien d'un dérivé diacétylé sans trace de mono-acétylé.

Le solvant de migration utilisé est du chlorure de méthylène additionné de 10 % de méthanol. La révélation est faite par pulvérisation d'acide sulfurique 0,5 N et chauffage. Les taches obtenues sont colorées en bleu violacé.



1. Dérivé acétylé
2. Portenstérol

Réactions colorées

Le dérivé acétylé donne, avec l'anhydride acétique et l'acide sulfurique, une coloration de Liebermann-Burchard rouge virant au violet.

La réaction de Salkowski, action de l'acide sulfurique concentré en milieu chloroformique, donne, comme pour le portenstérol, une coloration fuschine très sensible et intense,

Données spectrales du dérivé acétylé

Spectre I.R. - Il présente des bandes ester à 1.740 et 1.240 cm^{-1} et d'autres bandes d'absorption à 1.650, 1.530 et 1.140 cm^{-1} .

Spectre de R.M.N. - Il est caractérisé par deux singulets à 2,03 et 2,06 ppm correspondant aux 6 hydrogènes de deux groupements acétyles et par un multiplet centré à 5,20 ppm correspondant à 3 protons éthyléniques. On note aussi à 4,86 ppm un signal dû aux 2 hydrogènes en α des groupements acétyles et des signaux dûs aux hydrogènes des groupes méthyles à 0,58 ; 0,80 ; 0,86 ; 0,98 et 1,08 ppm.

2. Cétone : Portenstérone.

Préparation

L'oxydation du portenstérol a été effectuée par le réactif de Jones. La composition de ce réactif est la suivante :

Anhydride chromique : 2,66 g.

Acide sulfurique concentré : 2,3 cc.

Eau distillée q.s.p. : 10 cc.

40 mg de portenstérol sont dissous dans 40 ml d'acétone. Le stérol étant assez peu soluble dans l'acétone il est nécessaire d'utiliser cette quantité importante d'acétone. On agite jusqu'à parfaite dissolution avant l'addition du réactif.

On ajoute ensuite 0,2 cc de réactif de Jones et on refroidit le mélange pendant quarante minutes à la température de la glace fondante en agitant constamment.

L'excès de réactif est ensuite détruit par 2 ml d'éthanol. On noie à l'eau distillée et on extrait à trois reprises par 70 ml d'éther. La solution éthérée est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydride, filtrée et distillée. Nous obtenons ainsi 36,5 mg de dérivé oxydé brut.

Propriétés physiques

Cristallisée du méthanol, cette cétone se présente sous forme de paillettes blanches brillantes. Elle fond à 263° en tube capillaire avec décomposition.

Nous avons donné le nom de portenstérone à cette nouvelle cétone.

Elle est soluble dans l'éthanol et le méthanol, légèrement soluble dans le chloroforme, l'acétone, l'éther, insoluble dans l'éther de pétrole.

La portenstérone est dextrogyre, en solution, dans un mélange à parties égales de chloroforme et de méthanol :

$$[\alpha] D^{20} = + 38^{\circ} \pm 2^{\circ} (c = 0,005 \text{ g/cc})$$

Analyse

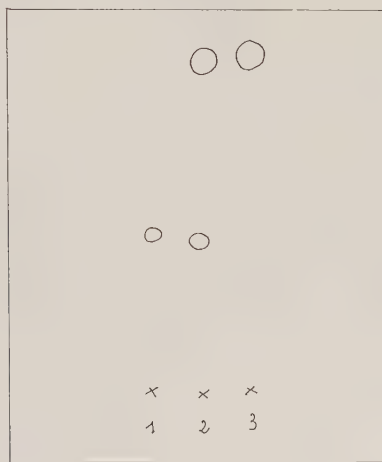
Comme le portenstérol et son dérivé acétylé, la portenstérone cristallise avec une molécule d'eau.

Analyse :	$C_{28} H_{40} O_2, H_2 O$		
Calculé % :	C 78,82	H 9,92	O 11,25
Trouvé :	78,74	9,97	10,95

Chromatographie sur plaque

La portenstérone donne une seule tache très nette, colorée en rouge vif après révélation par l'acide sulfurique 0,5 N et chauffage. Le solvant de migration est du chlorure de méthylène contenant 7,5 % de méthanol.

Le Rf. de la portenstérone est de 0,89 alors que, dans ces conditions, celui du portenstérol est de 0,40.



1. Portenstérol
2. Mélange de portenstérol et de portenstérone
3. Portenstérone

Réactions colorées

La réaction de Liebermann-Burchard est négative. L'addition d'anhydride acétique et d'acide sulfurique donne seulement une coloration jaune orangé.

Quelques milligrammes de cétone traités par de l'acide sulfurique concentré donnent une coloration rouge orangé très intense.

Données spectrales de la portenstérone

Spectre U.V. - Il montre une absorption à 250 m μ avec $\varepsilon = 11730$. ($c = 0,05$ g/l dans l'éthanol neutre).

Spectre I.R. - Il est caractérisé par une bande d'absorption à 1.710 cm^{-1} due à une fonction cétone non conjuguée et une bande à 1.670 cm^{-1} due à une cétone conjuguée. On note d'autres bandes à 1.450 , 1.375 et 1.230 cm^{-1} .

Spectre de masse. - Il indique un pic moléculaire $M+$ à m/e 408. Les autres pics sont à m/e 393 ($M-15$), 283 ($M-125$), 269, 257, 229, 137, 81, 69 et 55.

Spectre de R.M.N. - Il est caractérisé par la présence, de 5,61 à 5,70 ppm, d'un triplet dû à un proton éthylénique couplé avec 2 hydrogènes en α , tandis que le signal situé de 5,16 à 5,26 ppm correspond à deux protons éthyléniques qui sont ceux de la chaîne latérale. On retrouve à 0,66 ; 0,80 ; 0,88 ; 1 ; 1,1 et 1,13 ppm les signaux des hydrogènes des groupements méthyles.

Réduction des fonctions cétones

Préparation du produit de réduction.

A 8 mg de portenstérone dissous dans 10 ml de méthanol on ajoute 20 mg de borohydrure de sodium et on laisse le mélange pendant trois heures à la température du laboratoire en agitant constamment. Dans ces conditions, la réaction de réduction est complète. Nous avons déterminé par chromatographies sur plaques le temps de réaction nécessaire pour obtenir une réduction quantitative.

On noie ensuite à l'eau distillée et on extrait à trois reprises par 15 ml de chloroforme. La solution chloroformique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et distillée. Il reste un résidu de 7 mg.

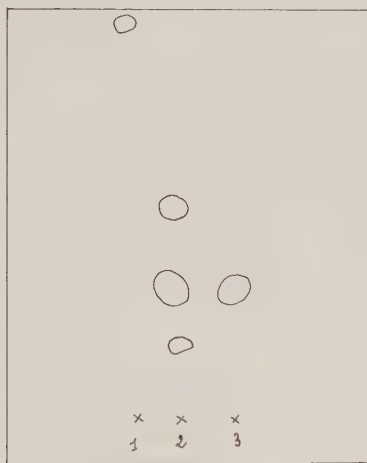
Etude du produit de réduction.

Etant donné les faibles quantités de produit dont nous disposons, nous l'avons étudié par chromatographies sur plaques. Celles-ci ont été effectuées en utilisant comme solvant le chlorure de méthylène contenant 7,5 % de méthanol. Les taches sont révélées par pulvérisation d'acide sulfurique 0,5 N et chauffage.

Le dérivé obtenu après hydrogénation de la cétone donne, dans tous les cas, trois taches. Ces taches sont toujours très nettes et sans

trainée. La tache qui a le Rf. le plus faible : 0,18, est colorée en vert pâle et elle est peu importante. Les deux autres taches, Rf. 0,32 et 0,53, sont colorées en bleu violacé comme le portenstérol.

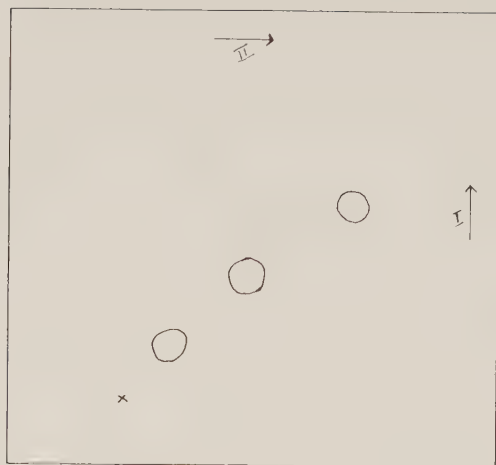
Une de ces taches a un Rf. identique à celle donnée par le portenstérol : 0,32.



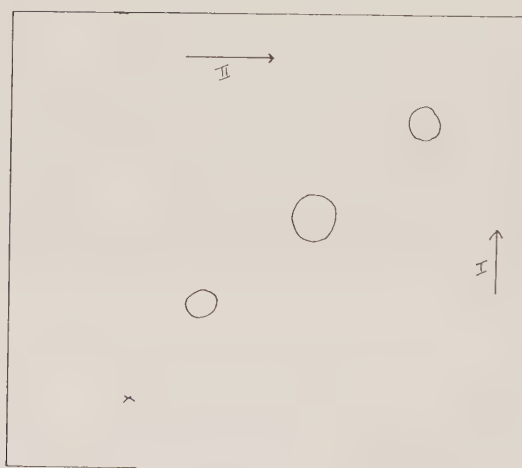
1. Portenstérone
2. Produit de réduction
3. Portenstérol

Pour confirmer la présence de portenstérol dans le produit d'hydrogénation nous avons effectué simultanément deux chromatographies bidimensionnelles, l'une avec le produit d'hydrogénation, l'autre avec un mélange à parties égales de produit d'hydrogénation et de portenstérol. Cette dernière ne présente aucune tache supplémentaire, donc une des taches obtenues dans la chromatographie du dérivé hydrogéné est bien donnée par le portenstérol.

Les deux autres taches correspondent certainement à des isomères du portenstérol formés lors de la réduction, ce qui est classique.



1. Produit de réduction



2. Mélange de produit de réduction et de portenstérol

AUTRES CONSTITUANTS

A côté des stérols, nous avons isolé du *Tricholome prétentieux* divers corps. Nous avons pu identifier certains d'entre eux : du soufre, des sels minéraux d'acides gras et des acides aminés.

SOUFRE

On trouve fréquemment le soufre dans des composés organiques chez les champignons comme chez les plantes supérieures, en particulier, il existe souvent dans certaines molécules d'acides aminés.

De nombreuses enzymes renferment des groupements thiols et ces enzymes jouent un rôle très important dans les différentes réactions indispensables à la vie des organismes.

D'autres composés organiques renfermant du soufre ont également été signalés chez les champignons. Citons en particulier des alcaloïdes soufrés et différents corps appartenant à des familles chimiques diverses dont certains constituent les principes toxiques des champignons.

Les cendres des plantes supérieures et des champignons renferment souvent une proportion élevée de sulfates.

La présence de soufre libre n'a jamais été signalée chez les champignons ni chez les plantes supérieures. Dans le règne végétal, VAN TIEGHEM, en 1884, (86) avait observé du soufre cristallisé dans le protoplasme de certaines algues et de divers bacilles, mais il n'avait pas isolé ce soufre.

Le *Tricholome prétentieux* possède un chapeau parfois teinté de jaune et, sous la cuticule, on remarque toujours une coloration jaune. Les lamelles, blanches chez les individus jeunes, prennent une teinte jaunâtre à la maturité. Sur le pied on remarque des plages jaune pâle ou jaune verdâtre. Nous avons pu montrer d'une manière à peu près certaine que ces colorations jaunâtres étaient dues à la présence de soufre dans ce champignon.

Nous avons isolé le soufre à partir de la fraction éluee au benzène lors de la chromatographie de l'extrait benzénique obtenu à chaud.

Devant la présence inattendue de soufre libre dans ce champignon, nous avons vérifié que ce soufre ne provenait pas des solvants utilisés pour l'extraction. D'autre part, il n'était pas possible, dans les conditions d'extraction où nous avons opéré, d'avoir une décomposition des acides aminés soufrés existant dans le *Tricholome prétentieux*.

Lors de toutes les extractions effectuées sur des lots de prove-

nance différente, nous avons toujours retrouvé du soufre à l'état libre. En raison des difficultés de cristallisation nous ne nous sommes pas attachés à l'obtenir cristallisé à chacune des extractions, cependant nous l'avons chaque fois identifié.

Isolement et identification

La solution benzénique obtenue par chromatographie est abandonnée, après concentration, au réfrigérateur. Des cristaux apparaissent après un séjour de deux mois environ et continuent à grossir pendant plusieurs mois. On obtient ainsi le soufre avec un rendement de 40 à 50 mg par kg de champignons secs, soit 3 à 4 mg par kg de champignons frais.

Ce soufre se présente sous forme de cristaux prismatiques jaunes et translucides. Il fond sous microscope à 113-114°. Le soufre cristallisé dans le système orthorhombique fond à 112,8° (70). Le soufre que nous avons obtenu est donc cristallisé sous la forme orthorhombique.

Nous l'avons aisément caractérisé, à l'état de sulfure de plomb, par action de l'acétate de plomb après transformation en sulfure de sodium.

L'analyse indique une pureté de plus de 99 %.

Il est intéressant de faire remarquer que le *Tricholome* prétentieux, qui a donc la particularité d'être le seul champignon connu renfermant du soufre à l'état libre, ne contient que de faibles quantités d'acides aminés soufrés ainsi que nous le verrons ultérieurement. On peut envisager soit que ce soufre provient du catabolisme des acides aminés, soit qu'il se forme à partir de corps soufrés que nous n'avons pas pu isoler.

Nous avons signalé que le *Tricholome* prétentieux renfermait un pigment, mais, tant ses solubilités que sa couleur, en milieu acide ou en milieu basique, le distinguent nettement du soufre.

SELS DE L'ACIDE PALMITIQUE

I. - Partie théorique

La répartition des substances lipidiques dans le règne végétal a été très étudiée. Nous avons donné précédemment un résumé de ces travaux concernant en particulier les cryptogames.

On a cherché non seulement à identifier ces lipides après les avoir isolés, mais aussi à les localiser à l'intérieur même de la cellule.

Ils se trouvent fréquemment sous forme d'esters avec des alcools, ce sont les lipides simples : glycérides avec le glycérol, céri-

des avec les alcools supérieurs, stérides avec les stérols. Parfois, ils forment des combinaisons avec le phosphore et l'azote donnant les lipides complexes : phospholipides et phosphoaminolipides.

Enfin, les savons résultent de la saponification des acides gras par les bases, principalement par la soude et la potasse.

L'isolement des lipides est délicat car ce sont des composés qui s'altèrent très facilement, leurs réactions d'oxydation sont très rapides. Leur identification est délicate car la plupart des méthodes physiques et chimiques permettent difficilement de choisir entre deux acides d'un poids moléculaire voisin. La spectrographie de masse permet la détermination de ce poids moléculaire avec certitude. De plus, ils sont souvent accompagnés de résines et d'autres substances inertes difficiles à éliminer.

Nous avons isolé du *Tricholome prétentieux* deux dérivés de l'acide palmitique qui sont des savons acides.

Les savons acides.

Les savons neutres ont la propriété de former avec l'acide gras lui-même des complexes cristallisables. Les complexes formés par l'acide palmitique et le palmitate de sodium sont particulièrement bien connus. Ces complexes sont appelés savons acides. Ils sont constitués par une ou deux molécules de savon neutre et une ou deux molécules d'acide palmitique (43).

Nous avons pu isoler à l'état cristallisé, à partir d'extraits alcooliques de *Tricholome prétentieux*, un savon acide de potassium (74) et un savon acide de sodium. Il ne nous a pas été possible de déterminer le nombre exact de molécules de savon neutre et d'acide constituant les complexes.

Ces savons acides ont un point de fusion bien inférieur à celui des savons neutres. Le palmitate de sodium, par exemple, fond à 270° alors que le complexe obtenu avec le palmitate de sodium et l'acide palmitique fond à 112° .

Ils sont aussi moins solubles dans l'eau que les savons neutres correspondants.

Leur spectre d'absorption dans l'infra-rouge présente peu de bandes d'absorption. Il est caractérisé par la présence, à 1.700 cm^{-1} d'une bande correspondant à la vibration du groupement $\text{C} = \text{O}$.

Nous avons constaté que ces complexes sont décomposés soit par hydrolyse en milieu acide, soit par chauffage sous vide à 180° .

Pour les étudier, nous les avons hydrolysés à froid en milieu acide. Après hydrolyse, la partie minérale, soluble dans l'eau, est facilement identifiée par spectrographie d'émission.

Acides gras.

Les acides gras sont des composés qui s'isolent en général assez facilement mais qui sont difficiles à obtenir purs. Ils sont presque toujours accompagnés de traces d'homologues supérieurs. Leur cristallisation est souvent très difficile car ils forment facilement des gels. Pour purifier cet acide, nous l'avons précipité de sa solution acétonique par de l'eau distillée en répétant plusieurs fois cette opération.

L'acide obtenu par hydrolyse du sel de sodium est identique à celui obtenu par hydrolyse du sel de potassium, comme le prouvent les chromatographies sur plaques et les analyses.

Cet acide fond à 58-60°. Parmi les acides gras courants, c'est l'acide palmitique qui a le point de fusion le plus voisin (62°).

Le spectre I.R. de cet acide possède seulement une bande intense à 1.690-1.710 cm^{-1} due à un groupement $\text{C} = \text{O}$.

Les quantités relativement faibles que nous avons pu isoler ne nous permettaient pas d'utiliser, pour son identification, toutes les méthodes classiques.

Pour un corps gras, il est classique d'indiquer ses indices de saponification, d'iode et d'acétyle. Mais ces déterminations demandent des quantités assez importantes de substances, il ne nous était donc pas possible de les effectuer.

Il était nécessaire de déterminer tout d'abord si nous avions à faire à un acide gras saturé ou insaturé.

La bromuration permet de mettre en évidence la présence de doubles liaisons. En effet, les acides gras renfermant des doubles liaisons ont la propriété de fixer sur celles-ci des atomes de brome pour donner des dérivés bromés saturés.



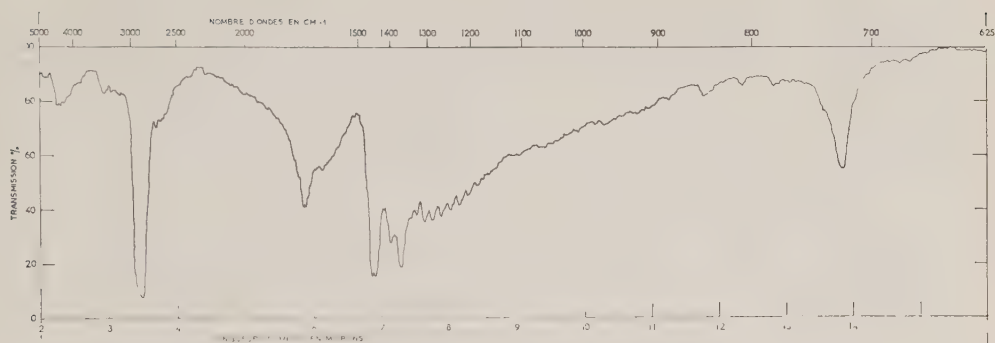
Le dérivé bromé est isolé, puis hydrolysé en milieu alcalin et le bromure formé est mis en évidence par une solution de nitrate d'argent.

Dans le cas de cet acide, il n'y a pas eu fixation de brome. Il s'agit donc d'un acide gras saturé.

Le fait que cet acide soit saturé est confirmé par l'analyse. Celle-ci correspond en effet à $\text{C}_{16} \text{H}_{32} \text{O}_2$, formule brute de l'acide palmitique.

Pour identifier avec certitude cet acide à l'acide palmitique nous avons préparé, par action du diazométhane, son dérivé méthylé. L'ester méthylique donne en effet en spectrométrie de masse des résultats plus précis que l'acide lui-même. Le spectre de masse est caractérisé par un pic moléculaire M^+ à m/e 270 correspondant bien à $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{14} \text{COOCH}_3$.

DONNEES SPECTRALES DES DERIVES DE L'ACIDE PALMITIQUE



Spectre I.R. du savon acide de potassium



Spectre de masse du palmitate de méthyle

II. - *Partie expérimentale*

1. *Les savons acides.*

A) *Savon acide de potassium.*

a) *Isolement.*

Nous avons vu que ce composé est isolé à partir de l'extrait alcoolique du *Tricholome prétentieux*. Cet extrait, après élimination de l'alcool et séchage, est traité à plusieurs reprises par du benzène à chaud. Les solutions benzéniques ainsi obtenues sont réunies, concentrées, puis chromatographiées sur alumine. Nous avons utilisé soit de l'alumine neutre, soit de l'alumine basique, les résultats ont été les mêmes. Le savon acide de potassium est élué à l'éthanol.

b) *Propriétés physiques.*

Après deux cristallisations de l'éthanol, il se présente sous forme de petits cristaux prismatiques blancs fondant, sous microscope, à 93-95°.

Il est soluble dans l'éthanol, le méthanol ; assez peu soluble dans l'éther de pétrole, l'éther, l'acétone, le chloroforme et l'eau.

Lorsqu'on le chromatographie sur plaque une partie seulement migre.

Son analyse indique qu'il renferme, suivant les échantillons, 12,5 à 12,9 % de résidu minéral.

c) *Sublimation.*

Ce composé ne se sublime pas. Mais, si on le maintient aux environs de 160° sous vide de 0.01 mm. il sublime un produit blanc fondant à 60°. Le corps sublimé est soluble dans l'éther et l'éther de pétrole et il est identique à l'acide gras obtenu par hydrolyse.

B) *Savon acide de sodium.*

a) *Isolement.*

L'extrait alcoolique, après reprise au benzène, est soumis à la fermentation par les levures. Après fermentation, il reste un résidu insoluble dans l'eau. On en élimine le mycelium des levures et on le chromatographie dans l'éther de pétrole sur Florisil. Le savon acide de sodium est élué à l'éthanol.

Il est intéressant de souligner la différence de solubilités entre le savon acide de potassium et le savon acide de sodium. Nous avons vu que le savon acide de potassium passait en solution benzénique alors que le savon acide de sodium est insoluble dans le benzène. Cette insolubilité dans les solvants organiques autres que l'alcool a rendu indispensable le traitement par les levures pour l'isolement du savon

acide de sodium. On pouvait penser que cette différence notable de solubilité entre ces deux complexes provenait d'une différence du nombre de molécules d'acide organique libre. Cette hypothèse est à rejeter car, compte tenu des poids atomiques respectifs du sodium et du potassium, les deux savons acides renferment à peu près la même quantité d'ions minéraux. Il faut donc penser que la différence de solubilité provient de différence de structure dans ces molécules et également de la nature de l'ion minéral.

Ce composé est difficile à purifier. Nous l'avons chromatographié de nouveau sur trente fois son poids de Florisil dans l'éthanol et, après plusieurs traitements au noir animal, nous l'avons cristallisé trois fois du méthanol.

b) Propriétés physiques.

Le savon acide de sodium se présente sous forme de petits cristaux blancs, irréguliers, fondant sous microscope à 112°.

Comme le savon acide de potassium il est peu soluble dans l'éther, l'éther de pétrole, l'acétone et l'eau ; soluble dans l'éthanol et le méthanol.

Son analyse fait apparaître une partie minérale de 6,8 à 7 %.

2. Hydrolyse.

Nous avons utilisé la même méthode pour hydrolyser les deux savons.

200 mg de savon acide sont dissous dans 40 ml d'eau distillée. On chauffe légèrement de manière à obtenir une solution colloïdale qui mousse. On ajoute alors 2 ml d'acide chlorhydrique concentré. Il se forme immédiatement un précipité blanc qui surnage.

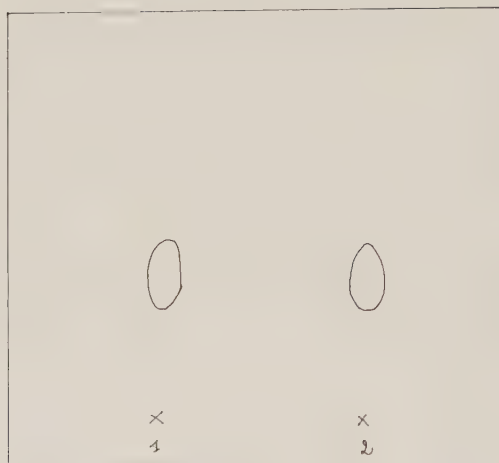
— Ce précipité est extrait trois fois par 80 ml d'éther de pétrole. Après séchage de la solution sur sulfate de sodium anhydre et élimination de l'éther de pétrole il reste un résidu de 162 mg d'acide gras.

— La solution aqueuse est concentrée sous vide jusqu'à un volume de 3 ml environ. On ajoute un excès d'éthanol pour précipiter le chlorure de potassium ou de sodium. Il est filtré, séché et constitue un résidu de 18 mg.

3. Etude de l'acide gras.

Nous avons vérifié, par chromatographie sur plaque, que l'acide gras obtenu par hydrolyse du sel de potassium était bien identique à celui obtenu par hydrolyse du sel de sodium.

On utilise comme solvant de migration du chloroforme contenant 10 % de méthanol et les taches sont révélées par pulvérisation d'acide sulfurique 0,5 N et chauffage. Elles apparaissent colorées en marron.



1. Acide gras obtenu par hydrolyse du savon acide de sodium
2. Acide gras obtenu par hydrolyse du savon acide de potassium

A) Fixation de brome.

A quelques milligrammes d'acide gras en solution dans du benzène on ajoute deux gouttes de brome. On élimine l'excès de brome par lavage avec une solution aqueuse d'hyposulfite de sodium puis on lave à l'eau. Après séchage de la solution benzénique sur chlorure de calcium on élimine le benzène. Le résidu est hydrolysé par 5 ml de solution de potasse alcoolique à 10 %, pendant une heure à 100°.

Après hydrolyse on recherche le bromure, après acidification par l'acide nitrique, par addition d'une solution de nitrate d'argent. On n'obtient aucun trouble.

B) Analyse.

Analyse :	$C_{16} H_{32} O_2$		
Calculé % :	C : 74,94	H : 12,58	O : 12,48
Trouvé :	75,01	12,57	12,54

C) Préparation du dérivé méthylé.

50 mg d'acide gras sont dissous dans 5 ml d'éther. On ajoute 10 ml de solution étherée de diazométhane préparée extemporanément (68) par action d'une solution alcoolique de potasse sur la nitroso-méthylurée. On laisse le mélange pendant 18 heures à la température du laboratoire puis on distille sous vide. On obtient un résidu pâteux qui constitue l'ester méthylique. Celui-ci est séché pendant 8 heures sous vide poussé avant d'être soumis à la spectrométrie de masse.

ACIDES AMINES

Nous avons vu que les différentes recherches relatives aux acides aminés contenus dans les champignons avaient montré que ces derniers en renfermaient seulement de petites quantités. En particulier les différents auteurs avaient souligné que les champignons étaient relativement pauvres en acides aminés soufrés.

Le *Tricholome prétentieux* ne se distingue pas des autres champignons, il renferme seulement de faibles quantités d'acides aminés et les acides aminés soufrés sont très peu abondants.

Nous avons identifié et dosé les acides aminés dans le résidu insoluble dans le benzène de l'extrait alcoolique. Ce résidu est dissous dans l'eau à la concentration de 10 %.

Dosage de l'azote aminé.

L'azote aminé a été dosé dans cette solution par la méthode de Sorensen. On admet généralement que la fonction amine des acides aminés est bloquée par un excès de formol et on titre leur fonction acide en présence de phénolphtaléine.

10 ml de solution sont neutralisés par de la soude N/10 jusqu'à virage au rose de la phénolphtaléine. On ajoute ensuite 20 ml de formol au 1/2 neutralisé. La teinte rose de la solution disparaît. Il a fallu ajouter 4 ml de soude N/10 pour faire réapparaître le virage.

La teneur en azote aminé de la solution à 10 % est donc de :

$$4 \times 0,14 = 0,56 \text{ g par litre.}$$

Le résidu contient donc 5,6 g par kg d'azote aminé.

1 kg de champignons secs fournissant 300 g d'extrait renferme donc :

$$5,6 \times 0,3 = 1,68 \text{ g d'azote aminé.}$$

Dosage de l'azote total.

Celui-ci a été dosé par la méthode de Kjeldahl. Cette méthode repose sur le fait que l'acide sulfurique détruit les substances organiques contenant de l'azote en transformant cet azote en sulfate d'ammonium. On opère en présence de catalyseurs : sulfate dipotassique et sulfate de cuivre. L'ammoniac est déplacé par de la soude et entraîné par de la vapeur dans une solution d'acide sulfurique titré. L'excès d'acide est dosé en retour par de la soude en présence de rouge de méthyle.

Le résidu d'évaporation de 10 ml de solution est additionné de 1 g de sulfate dipotassique et de 0,1 g de sulfate de cuivre. On ajoute 10 ml d'acide sulfurique concentré et on chauffe à feu nu jusqu'à ce que la solution prenne une couleur bleu clair et soit parfaitement

limpide, ce qui indique que la minéralisation est totale. Après refroidissement on ajoute 20 ml d'eau puis on additionne de 30 ml de lessive de soude. On relie à un générateur de vapeur et on reçoit le distillat dans 15 ml d'acide sulfurique N/10. L'excès d'acide est titré par de la soude N/10. On verse 1,22 ml pour obtenir le virage du rouge de méthyle.

Quantité d'azote contenue dans les 10 ml de la prise d'essai :

$$(15 - 1,22) \times 0,0014 = 19 \text{ mg}$$

soit 1,9 g pour 100 g d'extrait.

Azote total contenu dans 1 kg de champignons secs :

$$1,9 \times 3 = 5,7 \text{ g}$$

$$\frac{\text{Azote aminé} \quad 1,68}{\text{Azote total} \quad 5,7} = \frac{\quad}{\quad} = 0,29$$

Ce rapport est nettement plus faible que celui trouvé par SZYMCZAK (82) dans le même champignon. Cet auteur indique un rapport de 0,47.

Nous avons effectué plusieurs dosages d'azote aminé et d'azote total. Nous avons trouvé des quantités d'azote total et d'azote aminé pratiquement constantes, quelles que soient l'origine et l'époque de la récolte. Il faut donc penser qu'il existe une différence de teneur en azote entre les champignons poussant dans le Massif Central et ceux récoltés en Pologne.

Mise en évidence des acides aminés.

Les acides aminés ont été identifiés par chromatographie à une dimension sur papier.

Le solvant utilisé pour la chromatographie était un mélange de butanol, d'acide acétique glacial et d'eau (4 - 1 - 5). Comme révélateur on a utilisé une solution de ninhydrine. 1,30 g de ninhydrine sont dissous dans 270 cc d'acétone, 15 cc d'eau et 15 cc d'acide acétique glacial.

Les acides aminés ont été identifiés par rapport à des témoins.

Nous avons mis en évidence d'une manière certaine les acides aminés suivants :

Phénylalanine	Alanine
Cystéine	Acide glutamique
Méthionine	Glycine
Tryptophane	Leucine
Lysine	

On note la présence de cinq acides aminés essentiels : alanine, leucine, lysine, méthionine et tryptophane.

SUCRES FERMENTESCIBLES

Les champignons contiennent d'assez nombreux sucres qui peuvent être identifiés notamment par chromatographie sur papier.

Nous nous sommes contentés de doser uniquement la quantité totale de sucres réducteurs, constitués principalement par du mannose.

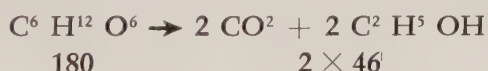
En effet, notre but était de transformer le plus quantitativement possible les sucres fermentescibles en alcool afin de pouvoir isoler plus facilement les stérols.

Pour contrôler le terme de la fermentation, nous avons effectué des dosages de l'alcool formé en continuant la fermentation jusqu'à ce que la teneur en alcool reste constante.

Le résidu de l'extrait alcoolique, privé des fractions solubles dans le benzène, est séché puis mis en solution dans de l'eau ordinaire. On prépare une solution à 10 %.

Cette solution estensemencée par des *Saccharomyces* et on laisse se poursuivre la fermentation selon la technique décrite dans un chapitre précédent.

Lorsque la fermentation est terminée, les sucres sont transformés en alcool et dosés selon la méthode de Nieloux.



L'alcool formé est séparé par distillation, puis on le dose par oxydation par le bichromate de potassium en milieu sulfurique. L'excès de bichromate est ensuite déterminé soit par iodométrie, soit en utilisant une solution de sulfate ferreux.

Substances réductrices volatiles exprimées en alcool éthylique : 5,24 g par litre.

100 g d'extrait correspondant à 4,5 kg de champignons frais, 1 kg de champignons frais renferme donc :

$$\begin{array}{r} 180 \times 5,24 \\ \hline 92 \\ \hline 4,5 \end{array} = 2,28 \text{ g de sucres fermentescibles}$$

Comme 13 kg environ de champignons frais fournissent 1 kg de champignons secs, dans 1 kg de *Tricholomes* prétentieux on a 29 à 30 g de sucres fermentescibles.

CORPS FONDANT A 103°

Nous avons effectué la plupart des chromatographies de l'extrait benzénique, obtenu par extraction à chaud, sur alumine. C'est seulement lors de nos dernières extractions que nous avons remplacé l'alumine par du Florisil 60/100 mesh, dans le but de faciliter la séparation de l'ergostérol. Ces chromatographies sur Florisil nous ont permis de séparer, par élution à l'éther, un nouveau corps fondant nettement à 103° sous microscope. Nous avons vainement essayé de l'isoler à partir des fractions obtenues par chromatographie sur alumine. Pour cette raison nous avons seulement disposé d'une faible quantité de produit.

Nous avons vu que, par chromatographie sur Florisil, l'ergostérol était élué au benzène. Ce corps existant dans la fraction obtenue après élution de l'ergostérol, nous avons recherché tout d'abord s'il était de nature stérolique. Il n'en est rien et il ne donne pas la réaction de Liebermann.

On le purifie aisément par trois recristallisations de l'éthanol.

Solubilités.

Ce produit est soluble dans l'éthanol, le méthanol, le chloroforme et l'acétone. Il est peu soluble dans l'éther, l'éther de pétrole, le benzène, et insoluble dans l'eau.

Analyse.

Son analyse correspond bien aux formules $C_{17}H_{34}O_2$ et $C_{28}H_{52}O_3$. Le spectre de masse n'a pas permis la détermination de son poids moléculaire, même au spectrographe MS9 il ne se produit aucune fragmentation.

Calculé $C_{17}H_{34}O_2$ % :	C = 75.73	H = 12.63	O = 11.74
$C_{28}H_{52}O_3$	75.67	12.70	11.63
Trouvé :	75.50	12.67	11.83

Spectre I.R.

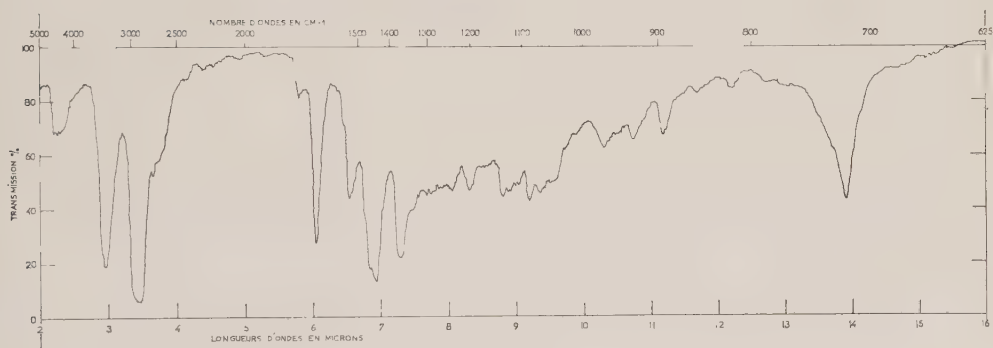
Son spectre I.R. présente une bande d'absorption très intense à 3.400 cm^{-1} , correspondant au groupement OH, une autre bande intense à 1.650 cm^{-1} et deux autres bandes à 1.525 et 1.725 cm^{-1} .

Le spectre I.R. montrant la présence d'hydroxyle, nous avons tenté d'acétyle ce composé.

Nous avons fait réagir à chaud l'anhydride acétique en présence de pyridine, en opérant comme pour l'acétylation des stérols.

Nous obtenons, après cristallisation de l'éthanol, un dérivé qui fond sous microscope à 54-55°. Cependant, malgré un séchage prolongé, ce dérivé n'a pas pu être obtenu anhydre, il retient des molécules de solvant de cristallisation. Son analyse et son spectre I.R. ne sont donc pas significatifs.

SPECTRE I.R. DU COMPOSE FONDANT A 103°



CHAPITRE III

ÉTUDE DU TRICHOLOME ÉQUESTRE

Parallèlement à l'étude de la composition chimique du Tricholome prétentieux, nous avons entrepris celle du Tricholome équestre.

La composition chimique du Tricholome équestre présente, comme on pouvait s'y attendre, certaines analogies avec celle du Tricholome prétentieux. Nous avons retrouvé dans ce champignon l'ergostérol, le savon acide de potassium de l'acide palmitique, du manitol et des acides aminés. Par contre, le stérol original que nous avons trouvé dans le Tricholome prétentieux n'existe pas dans le Tricholome équestre. La composition chimique du Tricholome équestre est donc moins originale.

Pour l'isolement de ses divers constituants, nous avons utilisé les mêmes méthodes que celles employées dans le cas du Tricholome prétentieux. En particulier, les extractions alcooliques ont toujours été précédées d'une extraction benzénique. Toutefois, en raison des teneurs différentes en certains produits, les méthodes d'extraction ont dûes être légèrement modifiées.

En particulier, ce champignon contient une proportion de savon acide de potassium de l'acide palmitique nettement plus importante que celle présente dans le Tricholome prétentieux. Pour faciliter l'isolement des autres constituants il est préférable de faire, avant l'extraction benzénique, un traitement préalable à l'éther de pétrole. On culève ainsi la totalité de ce savon.

D'autre part, en raison de l'absence de portenstérol, il n'a pas été nécessaire de faire l'extraction benzénique par percolation. Toutes les extractions ont donc été effectuées à l'ébullition.

ERGOSTEROL

Nous avons isolé de l'ergostérol par chromatographie des résidus d'extractions benzéniques. Les rendements obtenus sont sensiblement identiques à ceux du *Tricholome prétentieux* : 400 à 500 mg par kg de champignons secs. Cet ergostérol a été identifié, parallèlement à celui extrait du *Tricholome prétentieux*, en le comparant à un échantillon d'ergostérol de référence. Ses constantes physiques, ses réactions colorées et surtout les spectres I.R., U.V., le spectre de masse et le spectre de R.M.N. sont absolument identiques. Nous ne les décrivons donc pas à nouveau ici.

Il ne semble pas que le *Tricholome équestre* contienne d'autres stérols en dehors de l'ergostérol.

SAVON ACIDE DE POTASSIUM DE L'ACIDE PALMITIQUE

Nous avons dit que le *Tricholome équestre* en renfermait des quantités beaucoup plus importantes que le *Tricholome prétentieux* : 1,8 à 2 g par kg de champignons secs au lieu de 0,1 g par kg.

On l'extrait facilement par l'éther de pétrole. Il précipite sous l'aspect de résidu marron après concentration de l'éther de pétrole et refroidissement. Il est ensuite purifié par plusieurs traitements au noir animal, en solution éthanolique, suivis de trois cristallisations de l'éthanol.

Il fond à 93-95°, comme le savon acide de potassium de l'acide palmitique isolé du *Tricholome prétentieux*.

Hydrolysé dans les mêmes conditions que celui-ci il se décompose en donnant du potassium, identifié par spectrographie d'émission, et un acide gras. Cet acide donne, en chromatographie sur plaque, une tache rigoureusement identique à celle de l'acide identifié à l'acide palmitique.

Son analyse correspond aussi à l'acide palmitique.

Analyse : $C_{16} H_{32} O_2$

Calculé % : C : 74,94 H : 12,58 O : 12,48

Trouvé : 75,39 12,51 11,94

PIGMENT

Du *Tricholome équestre* nous avons isolé un pigment qui présente des analogies avec celui retiré du *Tricholome prétentieux*. Comme ce dernier, on l'obtient par élution à l'alcool amylique ou propylique lors de la chromatographie de l'extrait benzénique.

Il est également soluble dans les solutions aqueuses de soude à 5 % en donnant une solution rouge vif qui vire au jaune en milieu acide.

MANNITOL

Le Tricholome équestre sec renferme 70 à 90 g de mannitol par kg. Il contient donc beaucoup plus de mannitol que le Tricholome prétentieux qui en a seulement 1 à 10 g par kg.

En raison de l'abondance du mannitol dans ce champignon nous nous sommes particulièrement attachés à étudier son dosage.

On isole le mannitol de la fraction extraite par l'éthanol.

CARACTÉRISATION ET DOSAGE DU MANNITOL

I. - PARTIE THEORIQUE

Le mannitol est un polyol extrêmement répandu dans le règne végétal. On le trouve en particulier chez les Oléacées où il constitue le composant essentiel d'une exudation sucrée : la manne. Il est réparti dans les différents organes des végétaux : organes souterrains, graines, écorce de tige, feuilles. On l'a isolé aussi de presque tous les champignons et de la plupart des algues brunes.

Le mannitol prend aussi naissance dans certaines fermentations biologiques.

Chez les Cryptogames il se trouve en quantités parfois très importantes et il peut constituer jusqu'à 20 % du poids sec de l'hymenium de certains Basidiomycètes.

D'après les travaux de BOURQUELOT (16) il semble être, chez les champignons, en équilibre avec le tréhalose. Les spécimens jeunes renferment beaucoup de tréhalose et peu de mannitol, tandis que les échantillons plus âgés sont beaucoup plus riches en mannitol qu'en tréhalose. Cette transformation du tréhalose en mannitol serait très rapide dès la récolte et se poursuivrait au cours de la dessiccation des champignons.

MUNTZ (66) a montré que ce phénomène était réversible et que, dans certains cas déterminés, le tréhalose pouvait se former aux dépens du mannitol.

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Le mannitol est un hexol de formule $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$ qui se présente sous forme de fines aiguilles soyeuses à saveur légèrement sucrée. Il fond à 166° .

Il est soluble dans l'eau, un peu soluble dans l'alcool, insoluble dans l'éther et les autres solvants organiques.

Il n'est ni réducteur ni fermentescible.

Le pouvoir rotatoire du mannitol naturel, en solution dans l'eau, est très légèrement lévogyre $-0,21^\circ$. Ce pouvoir rotatoire a la propriété d'être très fortement exalté en présence de certaines substances, cette propriété peut servir à le doser.

DOSAGE

Le mannitol peut être dosé par trois procédés :

— Dosage pondéral.

— Dosage chimique.

— Dosage polarimétrique.

Nous verrons successivement le principe de ces trois dosages.

Le dosage chimique dose, en même temps que le mannitol, les sucres et les glycols, le dosage polarimétrique dose à la fois le mannitol et le sorbitol, seul le dosage pondéral permet de doser exclusivement le mannitol.

Le sorbitol n'a jamais été signalé chez les champignons et nous avons vérifié, en particulier par chromatographies sur plaques (20), qu'il n'existait pas dans le *Tricholome équestre*. Les chiffres obtenus pour le dosage polarimétrique correspondent donc seulement au mannitol.

Dosage pondéral.

Il est basé sur la solubilité du mannitol dans l'éthanol à chaud. Malgré la grande solubilité de ce composé dans l'eau, l'extraction par l'eau ne permet pas d'isoler le mannitol pur en raison des différents corps présents dans l'extrait.

Afin d'éliminer les substances gênantes nous avons fait précéder l'extraction par l'éthanol d'une extraction au benzène. Celui-ci élimine les stérols, les corps gras et des résines. Après concentration à demi, la solution éthanolique est maintenue pendant quelques jours au réfrigérateur. Le mannitol cristallise pratiquement quantitativement. Il est filtré, lavé par de l'éthanol glacé, séché sous vide et pesé.

La concentration ultérieure de la solution mère ne laisse pas

cristalliser de mannitol. Nous avons vérifié que, dans la solution mère, il ne reste que des traces négligeables de mannitol. Pour cela, après élimination de l'éthanol, le résidu est repris par de l'eau distillée puis déféqué par de l'acétate basique de plomb. Après élimination de l'excès d'acétate de plomb et distillation de l'eau, on chromatographie le résidu dans l'éthanol. Par élution à l'éthanol on n'obtient que 100 à 150 mg de mannitol à partir de 1 kg de champignons secs.

Dosage chimique.

Certains dosages chimiques sont basés sur la formation de complexes avec des hydroxydes métalliques en milieu alcalin (31), mais la méthode la plus classique est celle de MALAPRADE modifiée par FLEURY.

Ce dosage est basé sur la propriété que possède le mannitol d'être oxydé par l'acide périodique selon le schéma suivant :



On utilise un gros excès d'acide périodique qui libère l'iode d'une solution d'iodure de potassium. L'iode ainsi libéré est titré par une solution d'hyposulfite de sodium.

Tant que le mannitol n'était pas parfaitement pur cette méthode nous a donné des résultats irréguliers. Nous l'avons donc seulement utilisée pour déterminer la pureté de certains échantillons de mannitol extraits du *Tricholome équestre*. Nous nous sommes servis des échantillons dont la pureté était supérieure ou égale à 99,5 % comme étalons pour le dosage polarimétrique.

Dosage polarimétrique.

Vers 1890 on a montré que le mannitol, considéré jusque là comme un composé inactif, était doué d'un pouvoir rotatoire lévogyre faible.

GERNEZ (41) puis TANRET (84) ont montré que le pouvoir rotatoire spécifique du mannitol était changé et exalté par le molybdate d'ammonium. Cette augmentation du pouvoir rotatoire est particulièrement importante en milieu acide. TANRET indiquait que l'on pouvait obtenir un pouvoir rotatoire de + 137° et FREREJACQUE (33) a trouvé pour ce complexe une valeur moyenne de + 169°. Les nombreuses mesures que nous avons effectuées nous ont permis de conclure que, dans des conditions bien définies, ce complexe donnait un pouvoir rotatoire constant de + 144° (73).

HENNELAITRE (45) avait admis l'existence d'un complexe de formule $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_8\cdot\frac{1}{2}\text{MoO}_3$ mais FREREJACQUE indiquait que ce pouvoir rotatoire était maximum lorsqu'on utilisait plus de deux molécules de MoO_3 par molécule de polyol. Nous avons constaté que l'on obtenait les mêmes valeurs en utilisant deux à quatre molécules de molybdate pour une molécule de mannitol.

Les auteurs ne sont pas d'accord sur l'influence des autres sucres, notamment du glucose, du fructose et du saccharose, sur le dosage polarimétrique (81). En raison de l'absence presque totale de ces sucres dans le *Tricholome équestre* nous n'avons pas eu à étudier ce problème.

MANZONE et TURI ont montré que le sorbitol donnait également un complexe avec les molybdates en milieu acide, et ils l'ont appliqué au dosage du sorbitol dans certains produits alimentaires (57).

Signalons que l'on a proposé d'utiliser d'autres complexes formés avec différents corps pour doser polarimétriquement le mannitol. Citons en particulier l'utilisation du borate de sodium et de l'acide arsénieux (2).

II. - PARTIE EXPERIMENTALE

1. - DOSAGE CHIMIQUE

Titration du mannitol cristallisé.

A 10 ml d'une solution à 15 mg % de mannitol dans l'eau distillée, on ajoute 10 ml d'une solution de périodate de potassium à 1 g % et 2,5 ml d'acide sulfurique à 5 %. On maintient la solution pendant 20 minutes au bain-marie bouillant, puis on ajoute 5 ml d'une solution de phosphate bipotassique à 12 % et 5 ml d'une solution d'iodure de potassium à 10 %. On dose l'iode libéré par une solution d'hyposulfite de sodium N/100. On compare avec un témoin fait avec de l'eau distillée.

$$\text{Mannitol \%} = \frac{(\text{cc S}_2\text{O}_3\text{Na}_2 \text{ témoin} - \text{essai}) \times \text{titre S}_2\text{O}_3\text{Na}_2 \times 1,82}{\text{poids en g dans 10 ml}}$$

Le mannitol isolé était toujours au moins à 99 %.

2. - DOSAGE POLARIMETRIQUE

a) Détermination de la valeur du pouvoir rotatoire du complexe mannitol-acide molybdique.

Nous l'avons déterminé sur du mannitol que nous avons extrait et pour lequel le dosage chimique montrait une pureté d'au moins 99,5 %. Nous indiquons ci-après un exemple de dosage.

Le mannitol est mis en solution dans l'eau distillée de manière à obtenir une solution à 0.356 %. On note la rotation observée pour la solution aqueuse.

On prépare ensuite le complexe en mélangeant 10 ml de solution de mannitol, 10 ml d'acide sulfurique normal et 10 ml d'une solution de paramolybdate d'ammonium à 6,2 g/°. On note la rotation observée pour le complexe.

$$\text{concentration} \quad \% = \frac{100 \times \Delta \alpha}{1 \times \Delta [\alpha] D^{25}}$$

$\Delta \alpha$: différence entre rotation de la solution molybdique et de la solution aqueuse.

$\Delta [\alpha] D^{25}$: différence algébrique entre pouvoir rotatoire spécifique de la solution molybdique et de la solution aqueuse.

Nous avons effectué de nombreuses mesures avec la solution contenant 0,356 % de mannitol. Si nous prenons, comme l'indique FREREJACQUE, la valeur de $+ 169^\circ$ pour $l'[\alpha]D$ du complexe, les valeurs trouvées pour les $[\alpha]D$ indiquent des concentrations variant entre 0,300 g % et 0,308 g %, la moyenne des valeurs étant de 0,303 g %.

Le pouvoir rotatoire du complexe est donc de :

$$\frac{0,303}{0,356} = \frac{x}{169} = + 144^\circ$$

Tous les dosages polarimétriques du complexe préparé à partir du mannitol pur nous ont donné des valeurs comprises entre $+ 143^\circ$ et $+ 145^\circ$.

b) Détermination de la teneur en mannitol dans le champignon.

50 g de *Tricholomes équestres* secs sont extraits au Soxhlet par 500 ml de benzène pendant huit heures puis, après séchage de la poudre, par 500 ml d'éthanol pendant huit heures.

L'éthanol est éliminé et le résidu est repris par 400 ml d'eau distillée. On ajoute de l'acétate de plomb jusqu'à cessation de précipitation. Après filtration, on élimine l'excès d'acétate de plomb par un courant d' H_2S . La solution filtrée est ajustée à 500 ml et on mesure la rotation de cette solution.

A 10 ml de cette solution on ajoute 10 ml d'acide sulfurique normal et 10 ml de solution de paramolybdate d'ammonium N/10. Si le mélange est trouble, on centrifuge. On note la nouvelle rotation. La différence entre les deux chiffres est de 0,66.

$$c \% = \frac{100 \times 0,66}{2 \times 144} = 0,23$$

soit pour les 10 ml de solution contenus dans le complexe :

$$\frac{0,23 \times 30}{10} = 0,692$$

et, dans la solution :

$$\frac{0,692 \times 500}{100} = 3,46$$

Poids de mannitol par rapport au champignon sec :

$$\frac{3,46 \times 100}{50} = 6,92 \text{ g } \circ_0$$

CHAPITRE IV

PRESENCE DE L'ERGOSTÉROL CHEZ DIVERS CHAMPIGNONS

Nous avons indiqué, dans la partie bibliographique, que l'ergostérol avait été signalé chez quelques Basidiomycètes. Comme nous avons trouvé l'ergostérol dans le Tricholome prétentieux et dans le Tricholome équestre, il nous a semblé intéressant de rechercher si ce stérol existait dans d'autres champignons du genre Tricholome.

Nous avons pu nous procurer les Tricholomes suivants : T. columbetta (Tricholome colombette), T. saponaceum (Tricholome à odeur de savon), T. sulfureum (Tricholome soufré), T. rutilans (Tricholome rutilant) et T. Georgii (Lyophyllum Georgii. Tricholome de la Saint-Georges).

Toutes ces espèces ont été récoltées dans le Puy-de-Dôme, le Tricholome de la Saint-Georges au printemps, les autres Tricholomes à l'automne.

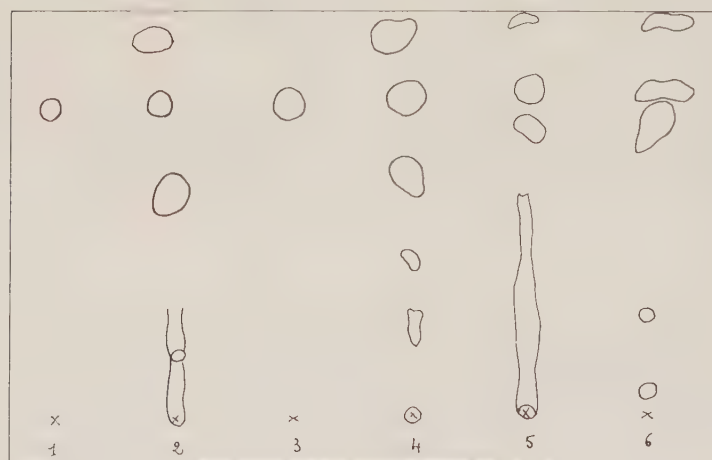
Extraction et mise en évidence de l'ergostérol.

Le séchage et l'extraction des différentes espèces ont été effectués selon la technique suivante.

Les champignons sont coupés en morceaux, puis le séchage est commencé à l'air libre et terminé à l'étuve à vide. Après pulvérisation, on extrait par le benzène à l'ébullition pendant huit heures. Après évaporation du benzène, le résidu obtenu est dissous dans l'éther puis chromatographié sur 15 fois le poids d'alumine. La fraction éluee à l'éther renferme l'ergostérol.

On met en évidence l'ergostérol par chromatographie sur plaque parallèlement à un échantillon d'ergostérol pur. Le solvant de migration utilisé est constitué par du chlorure de méthylène renfermant 5 % de méthanol. La révélation est faite par pulvérisation d'acide sulfurique 0,5N suivie d'un chauffage à l'étuve à 100°. La tache correspondant à l'ergostérol est nettement séparée et elle est colorée en violet.

Avec les extraits de tous les Tricholomes étudiés nous obtenons une tache de Rf. 0,78, identique à celle de l'ergostérol utilisé comme témoin.



1. Ergostérol témoin
2. Extrait de Tricholome soufré
3. Extrait de Tricholome rutilant
4. Extrait de Tricholome colombette
5. Extrait de Tricholome à odeur de savon
6. Extrait de Tricholome de la Saint-Georges

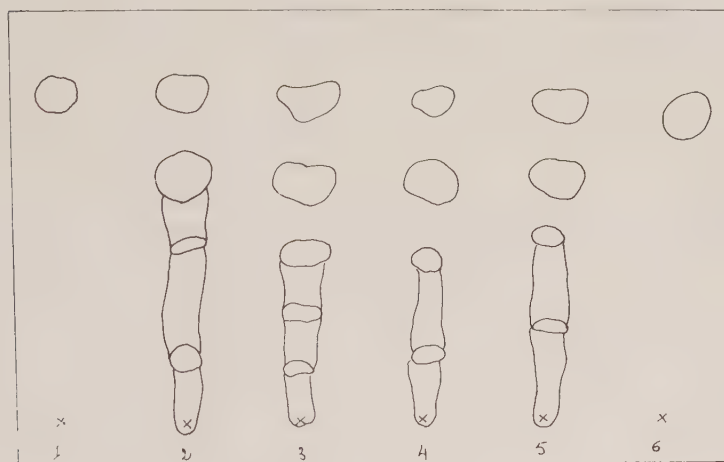
Devant la présence constante d'ergostérol dans les différentes espèces de Tricholomes étudiées, nous avons pensé qu'il serait intéressant de le rechercher dans d'autres familles de Basidiomycètes et chez les Ascomycètes. Pour le moment nous nous sommes limités aux cinq espèces suivantes : *Clitocybe geotropa* (*Clitocybe geotrope*), *Clitocybe nebularis* (*Clitocybe nébuleux*), *Entoloma lividum* (*Entolome livide*), *Fistulina hepatica* (*Langue de bœuf*), appartenant aux Basidiomycètes, et *Morchella conica* (*Morille conique*) qui fait partie du groupe des Ascomycètes.

En utilisant la technique employée pour les *Tricholomes* nous avons mis en évidence, d'une manière certaine, la présence d'ergostérol chez le *Clitocybe nébuleux*, le *Clitocybe geotrope*, la *Langue de bœuf* et la *Morille*.

Dans le cas de l'*Entolome livide*, on remarque seulement au Rf. 0,78 une tache peu nette et très peu colorée. Nous avons répété plusieurs fois les extractions et les chromatographies et nous avons toujours obtenu les mêmes résultats. Il ne nous est donc pas possible de conclure à la présence ou à l'absence d'ergostérol.

L'ergostérol semble donc présent dans de nombreuses familles de champignons. Nous nous proposons de vérifier s'il existe dans la plupart des champignons.

Dans les chromatographies sur plaque des extraits de *Clitocybe nébuleux*, de *Clitocybe geotrope*, d'*Entolome livide* et de *Langue de bœuf*, on remarque une tache nette, colorée en violet, possédant un Rf. de 0,57. Cette tache indique la présence d'un stérol ou d'un Triterpène. Il sera intéressant, si nous pouvons nous procurer des quantités suffisantes de ces espèces, d'essayer d'isoler ce corps.



1. Ergostérol témoin
2. Extrait de *Clitocybe nébuleux*
3. Extrait de *Clitocybe geotrope*
4. Extrait d'*Entolome livide*
5. Extrait de *Langue de bœuf*
6. Extrait de *Morille*

CONCLUSIONS

Nous avons abordé notre travail sur les *Tricholomes* dans le but d'apporter une contribution à la composition chimique, fort peu connue, des *Basidiomycètes*, et dans l'espoir qu'il nous conduirait à l'isolement de corps nouveaux.

Nous avons tout d'abord été amenés à étudier le problème du séchage et celui de l'extraction. Ces deux opérations préliminaires étaient rendues particulièrement délicates par suite de la grande teneur en eau et de la mauvaise conservation des champignons. Après de nombreux essais nous avons pu établir des conditions précises d'extraction qui permettent des opérations le plus souvent très longues, mais parfaitement reproductibles.

La composition chimique du *Tricholome* prétentieux s'est révélée la plus intéressante. C'est pourquoi la plus grande partie de ce travail est consacrée à son étude. Nous avons mis en évidence ou identifié des corps de natures chimiques diverses.

On savait que les champignons contenaient des matières grasses mais il s'agissait le plus souvent de glycérides classiques. Nous avons pu isoler à l'état cristallisé un savon acide de potassium et un savon acide de sodium. Dans les deux cas l'acide palmitique constitue la partie organique. Cette identification a été faite avec certitude grâce au spectre de masse effectué sur son ester méthylique.

Dans le *Tricholome* équestre nous avons retrouvé, en quantités nettement plus importantes, le savon acide de potassium.

La présence de soufre à l'état libre n'avait jamais été signalée dans le règne végétal. Nous avons trouvé dans le *Tricholome* prétentieux du soufre libre en faible quantité mais de façon constante. Nous pouvons affirmer qu'il n'a pas été introduit lors de l'extraction par les solvants ou formé par décomposition de dérivés soufrés, mais qu'il représente bien un des constituants du champignon.

Le mannitol est un polyol qui se rencontre chez tous les cham-

pignons. Nous l'avons retrouvé chez les *Tricholomes* étudiés, mais en quantités très variables. Le *Tricholome* équestre en renferme de grandes quantités. Cela nous a permis de mettre au point une méthode de dosage de ce polyol qui peut être appliquée à son dosage dans tous les champignons.

Les champignons renferment un nombre important d'acides aminés, mais presque toujours en quantités relativement faibles et ils ne contiennent pas tous les acides aminés dits essentiels. Nous avons confirmé ce fait pour le *Tricholome* prétentieux. Il convient de rapprocher sa faible teneur en acides aminés soufrés de la présence de soufre.

L'ergostérol avait été signalé chez les *Ascomycètes* et chez les *Basidiomycètes*, mais seulement chez un nombre d'espèces assez restreint.

Les *Tricholomes* prétentieux et équestre renferment en quantités sensiblement identiques ce stérol. La chromatographie sur plaque effectuée avec un témoin, ses spectres U.V., I.R., de R.M.N. et de masse, nous ont permis de l'identifier sans erreur possible.

L'ergostérol semble être beaucoup plus répandu chez les champignons qu'on ne le croyait jusqu'à présent. Nous l'avons retrouvé d'une manière presque constante dans différentes autres espèces de *Tricholomes* et dans divers genres appartenant aux *Basidiomycètes* et aux *Ascomycètes*.

Le résultat le plus important obtenu dans nos recherches a certainement été l'isolement, à partir du *Tricholome* prétentieux, d'un nouveau stérol auquel nous avons donné le nom de portenstérol.

Le *Tricholome* prétentieux en renferme de très faibles quantités, environ 75 mg par kg de champignon sec, soit 6 mg par kg de champignon frais. Cette faible teneur, jointe à l'obligation de l'extraire par percolation, ont rendu son isolement très délicat.

Ce nouveau stérol possède la formule $C_{28}H_{44}O_2$. C'est un isomère monohydroxylé de l'ergostérol, l'hydroxyle supplémentaire étant situé également sur le noyau. Les deux fonctions hydroxyles sont secondaires. Nous avons pu préparer le dérivé diacétylé et la dicétone correspondante. Il possède trois doubles liaisons dont une dans la chaîne latérale. Sa chaîne est donc identique à celle de l'ergostérol.

Nous nous sommes largement aidé des méthodes physiques modernes pour l'étude de sa structure : spectres I.R., de R.M.N. et de masse. En raison des faibles quantités dont nous avons disposé, il ne nous a pas été possible de situer avec certitude la position de l'un des hydroxyles et celles des deux doubles liaisons nucléaires.

Le portenstérol est le premier stérol dihydroxylé du groupe de l'ergostérol connu. Ce résultat très intéressant nous incitera à continuer à explorer la composition chimique des *Basidiomycètes*.

Vu :

Clermont-Ferrand, le 19 Juin 1967,

Le Président de Thèse,

H. POURRAT.

Vu et approuvé :

Clermont-Ferrand, le 19 Juin 1967,

Le Doyen de la Faculté mixte
de Médecine et de Pharmacie,

G. MEYNIEL.

Vu et permis d'imprimer :

N° 29/67

Clermont-Ferrand, le 19 Juin 1967,

Le Recteur de l'Académie,

Président du Conseil
de l'Université,

E. LAPALUS.

BIBLIOGRAPHIE

1. — AKHTAR M. « *Biosynthetic events in the elaboration of ergostérol side chain* ». Conférence faite à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles. Gif-sur-Yvette le 24-4-1967.
2. — BADREAU J. « *Dosage de la Mannite par les procédés polarimétriques* ». Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris, 1921.
3. — BANSLAUGH G., JUST G. et BLANK F. « *Nature* », 1964, 202 (4.938), 1.218.
4. — BELLAMY. « *The Infra-red spectra of complex molécules* », 2nd Ed., Wiley, New York, 1958.
5. — BENEDICT R. G., TYLER V. E., BRADY L. R. et STUNTZ D. E. « *Planta medica* », 1964, 12, 100-106.
6. — BENTLEY K. W. « *Technique of organic chemistry. Elucidation of structures by physical and chemical methods* ». Interscience publishers New York, 1963.
7. — BENTLEY R., LAVATE W. V. et SWEeley C. C. « *Comp. Biochem. physiol.* », 1964, 11 (3), 263-268.
8. — BERTRAND G. et BERTRAND D. « *Ann. Agro.* », 1947, 17, 323-328.
9. — BERTRAND G. et BERTRAND D. « *C. R. Acad. Sci.* », 1949, 229, 453-455.
10. — BIEDER A. « *Recherche sur l'oxydation périodique des oses et polyols stéréoisomères* ». Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris, 1953.
11. — BIEMANN K. « *Mass spectrometry. Organic chemical applications* ». Mc Graw-Hill Book company, New York, 1962.
12. — BOITEAU P., PASICH B. et RATSIMAMANGA R. « *Les Triterpénoïdes en physiologie végétale et animale* ». Gauthier-Villars, Paris, 1964. 764-771.
13. — BONNET J. L. « *Application de la chromatographie sur papier à l'étude de divers champignons (Basidiomycètes, Hyménomycètes)* ». Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris, 1959.
14. — BONNET J. L. « *Bull. Soc. Mycol. Fr.* », 1959, 216.
15. — BOURQUELOT E. « *Bull. Soc. Mycol. Fr.* », 1889, 5, 34 et 132. 1890, 6, 150. 1891, 7, 50. 1892, 8, 113 et 201.
16. — BOURQUELOT E. « *C. R. Acad. Sci.* », 1889, 108, 568. 1890, 111, 534.
17. — BOURQUELOT E. « *J. Pharm. chim.* », 1889, 19, 369. 1891, 24, 521.
18. — BUDZIKIEWICZ H., DJERASSI C., WILLIAMS D. H. « *Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds* ». Holden Day, San Francisco, 1964.
19. — CAHN R. S. « *An Introduction to Chemical Nomenclature* ». Butterworths publications, London, 1959.
20. — CASTAGNOLA V. « *Boll. Chim. Farm.* », 1963, 102, 784.

21. — « *Champignons d'Europe* ». Collection de documents d'Histoire Naturelle S.F.L. Paris.
22. — COMBES R. « *La vie de la cellule végétale* ». 4^e édition, Armand Colin, Paris, 1948.
23. — CROSS A. D. « *Introduction to pratical Infra-red spectroscopy* ». Butterworths publications, London, 1960.
24. — D'après C. A. 1964, (2), 4702^c.
25. — DECORPS P. « *Recherches sur la composition chimique des graines d'une Crucifère : l'Ibérís amara* ». Thèse Doct. Etat Pharm. Clermont-Ferrand, 1963.
26. — DONALD H. HUGHUES. « *Proc. Intern. Conf. Sci.* », 1962, 540-546.
27. — DURAND M. et BONNET J. L. « *Rev. Médicale Tours* », 1960, 3, 199-217.
28. — DURAND M. et BONNET J. L. « *Rev. Médicale Tours* », 1961, 13, 233-238.
29. — FIESER L. F. et FIESER M. « *Steroids* ». Reinhold Publ. corp. New York, 1959.
30. — FIESER L. F., FIESER M. et RAJAGOPALAN S. « *J. Org. Chem.* », 1948, 13, 800.
31. — FLORET G. et MASSA M. V. « *Ann. pharm. fr.* », 1966, 24 (3), 201-208.
32. — FREREJACQUE M. « *Revue Mycol.* », 1939, 4, 89-97.
33. — FREREJACQUE M. « *C. R. Acad. Sci.* », 1935, 200, 1.410.
34. — FREREJACQUE M. « *C. R. Acad. Sci.* », 1939, 208, 1.123.
35. — FRIEDLAND S. S., LANE G. H., LONGMAN R. T., TRAIN K. E. et O'NEAL M. J. « *Anal. Chem.* », 1959, 31, 169-174.
36. — FRIGOT P. « *Prod. Pharm.* », 1961, vol. 16, n° 9.
37. — FUERST W. « *Arch. Pharm.* », 1965, 298 (11), 795-804.
38. — GAUDEMER A., POLONSKY J., GMELIN R., ADAM H. et Mc CORKIN-DALE N. « *Bull. Soc. chim.* », 1967, 5, 1844.
39. — GEIGY J. R. « *Documenta.* », 6^e édition, Elli Pagani, Milan.
40. — GERARD E. « *Thèse Doct. Méd.* » Toulouse 1895. n° 65.
41. — GERNEZ D. « *C. R. Acad. Sci.* », 1891, 112, 1.360.
42. — GORIS A. et MASCRE M. « *C. R. Acad. Sci.* », 1911, 153, 1.082.
43. — GRIGNARD V., DUPONT G. et LOCQUIN R. « *Traité de Chimie Organique* ». Masson et Cie, Paris, 1939, T. 9.
44. — HEIM R. « *Les champignons d'Europe* ». Boubée, Paris, 1957.
45. — HENNELAITRE A. « *Ann. Chim.* », 1925, 3, 54.
46. — IKEGUCHI T. « *Journ. Biol. chem.* », 1919, 40, 175.
47. — INAGAKI S. et TOKI M. « *J. pharm. Soc. Japan* », 1944, 64, 132.
48. — « *J. chem. Soc.* », 1951, 3.526.
49. — KLYNE W. « *La chimie des stéroïdes* ». Gauthier-Villars. Paris. 1966.
50. — KOCOR M., MALUNOWICZ I. et SZWED K. « *Bull. Acad. Polon. Sci.* », 1960, 8, 337-343 d'après C. A. 1963, 3.482 c.
51. — KONRAD P. et MAUBLANC A. « *Les Agaricales* ». Paul Lechevalier, Paris, 1948.
52. — KUHNER R. et ROMAGNESI H. « *Flore analytique des champignons supérieurs* ». Masson & Cie, Paris, 1953.
53. — LATCHE J. C. « *C. R. Acad. Sci.* », 1963, 257 (15), 2.145-2.147.
54. — LEBEAU P. et JANOT M. M. « *Traité de Pharmacie Chimique* ». Masson & Cie, Paris, 1955-56, 3, 1.971.
55. — LIST P. H. et REINHARD C. « *Arch. Pharm.* », 1962, 295, 564-571.
56. — LOVIAGINA E. V. et SHIVRINA A. N. « *Biokhimija* », 1962, 27, 794-800, d'après C. A. 1963, 8.327 f.

57. — MANZONE A. M. et TURI C. J. « *Ann. Chim.* » (Italie), 1961, 51, 220.
58. — MATHIEU J. P. et PETIT A. « *Constantes sélectionnées. Pouvoir rotatoire naturel* ». I. Stéroïdes. Masson & Cie, Paris, 1956.
59. — MAUBLANC A. « *Champignons de France* ». Paul Lechevalier, Paris, 1959.
60. — MENTZER C. « *Bull. Soc. Bot. Fr.* », Mémoires 1965.
61. — METROD G. Supplément « *Rev. Mycol.* », 1942, 7, 22.
62. — MOREAU F. « *Les Champignons* ». Paul Lechevalier, Paris 1952.
63. — MOREAU F. « *Botanique* ». Encyclopédie de la Pléiade, Gallimard, Paris, 1960.
64. — MOSCOWITZ A., CHARNEY E., WEISS U., ZIFFER H. « *J. amer. chem. Soc.* », 1961, 83, 4.661.
65. — MOUSSERON M. et FAUROUX P. « *Bull. Soc. Chim. Biol.* », 1932, 14, 1.235-39.
66. — MUNTZ. « *Ann. Ch. Phys.* », 1876, 8, 56.
67. — NOLLER C. R., SMITH R. A., HARRIS G. H. et WALKER J. W. « *J. amer. chem. Soc.* », 1942, 64, 3.047.
68. — « *Organic Synthèse* », II, 165.
69. — OURISSON G. et CRABBÉ P. « *Les triterpènes tétracycliques* ». Hermann, Paris, 1961, p. 15 et 118-130.
70. — PASCAL P. « *Nouveau Traité de Chimie Minérale* », Masson & Cie, 1961, T. XIII.
71. — « *Planta* », 1965, 64 (1), 83-93 d'après C. A. 1965 (1), 10.835 d.
72. — POURRAT A. « *Sur les triterpènes et tanins de quelques rosacées* ». Thèse Doct. Etat Pharm. Clermont-Ferrand, 1962.
73. — POURRAT H. et GOMET F. « *Bull. Soc. Chim.* », 1962, 7, 1.280.
74. — POURRAT H. et GOMET F. « *Bull. Soc. Chim.* », 1963, 10, 2.008.
75. — RAO C. N. R. « *Ultra-Violet and visible spectroscopy. Chemical applications* ». Butterworths publications, London, 1961.
76. — ROMAGNESI H. « *Nouvel Atlas des champignons* ». Bordas, 1958, T. II, pl. 88 et 89.
77. — SCOTT A. I. « *Interpretation of the Ultra Violet spectra of Natural products* ». Pergamon press, New York, 1964, 63.
78. — SHOPPEE C. W. « *Steroid Chemistry* ». Butterworths publications, London, 1957.
79. — SMEDLEY, MAC LEAN et THOMAS. « *Biochem. J.* », 1920, 14, 491.
80. — STAHL E. « *Thin layer chromatography* ». Academic Press, New York, 1965.
81. — STANISLAS E., GAYREL P. et BARTHES H. « *Toulouse Pharmaceutique* », 1962, 9, 2.
82. — SZYMCZAK J. « *Roczn. Chem.* », P.Z.H. 1962, 13 (5), 467-472.
83. — TANRET C. « *C. R. Acad. Sci.* », 1889, 108, 98, et 1908, 147, 75.
84. — TANRET C. « *C. R. Acad. Sci.* », 1921, 172, 1.508.
85. — TSUDA K. et SAKAI K. « *Chem. Pharm. Bull.* », Tokyo, 1960, 8, 554.
86. — VAN TIEGHEM Ph. « *Traité de Botanique* ». Savy, Paris, 1884, I. 526.
87. — WATTIEZ N. et STERNON F. « *Éléments de Chimie végétale* ». Masson & Cie, Paris, 1942.
88. — WIELAND H. et COUTELLE G. « *Ann. Chem.* », 1941, 548, 270-275.
89. — ZAKIA BANO, RIAZ A. et SHRIVASTANA H. C. « *J. Indian chem. Soc.* », 1964, 2 (9), 380-381.
90. — ZELLNER J. et BARD L. « *Monatsh. Chem.* », 1923, 44, 9-17.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ :

SUBSTANCES ANTIBIOTIQUES

RETIRÉES

DES VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	13
Première partie : DESCRIPTION DU TRICHOLOME PRETENTIEUX ET DU TRICHOLOME EQUESTRE	17
Deuxième partie : RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES :	
COMPOSITION CHIMIQUE DES CHAMPIGNONS SUPERIEURS	27
— Teneur en eau	27
— Constituants minéraux	28
— Constituants glucidiques	28
— Acides gras	29
— Acides aminés	29
— Triterpènes et stérols	30
- Triterpènes isolés des champignons	31
- Passage des triterpènes aux stérols	33
- Stérols isolés des champignons	34
- Isomérisation des stérols	36
Troisième partie : RECHERCHES PERSONNELLES	39
Chapitre premier : Récolte - Séchage - Extraction	41
— Récolte	41
— Séchage	42
- Séchage à l'air libre	42
- Séchage à basse température	43
- Séchage au four à haute fréquence	43
- Séchage industriel	45
- Rendements en substances sèches	46
— Extraction	47
Chapitre II : Tricholome Prétentieux	49
— Isolement des différents constituants	49
- Isolement des stérols	50
- ergostérol	50

- portenstérol	52
- Isolement des palmitates et des acides aminés	53
- Isolement du mannitol	54
- Isolement d'un pigment et d'un corps fondant à 103° ...	55
— Ergostérol :	
- L'ergostérol dans les champignons	59
- Partie théorique	59
- Partie expérimentale	65
— Fortenstérol :	
- Partie théorique	68
- Critères d'identification	68
- Détermination de la structure des stérols	71
- Discussion de la structure du portenstérol	75
- dérivé acétylé	78
- portenstérone	80
- Partie expérimentale	87
- Fonction alcool	90
- dérivé acétylé	90
- portenstérone	92
— Autres constituants :	
- Soufre	97
- Sels de l'acide palmitique	98
- Partie théorique	98
- Partie expérimentale	102
- les savons acides	102
- hydrolyse	103
- étude de l'acide gras	103
- Acides aminés	105
- Sucres fermentescibles	107
- Corps fondant à 103°	108
Chapitre III : Etude du Tricholome Equestre	111
— Ergostérol	112
— Savon acide de potassium de l'acide palmitique	112
— Pigment	112
— Caractérisation et dosage du mannitol :	
- Partie théorique	113
- Partie expérimentale	116
Chapitre IV : Présence de l'ergostérol chez divers champignons.	119
CONCLUSIONS	123
BIBLIOGRAPHIE	127

